



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# **COOPERACIÓN FUNCIONAL DE NOTCH1 E IL-7R EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T HUMANOS Y EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA LEUCEMIA T LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Tesis Doctoral

**Sara González García**  
Madrid, 2011

Directora: Dra. M<sup>a</sup> Luisa Toribio García





Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, centro mixto perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, con financiación de los proyectos GEN2003-20649-C06-02/NAC, SAF2004-01122, BFU2007-60990 y PLE2009-0110 del Ministerio de Ciencia e Innovación; S-SAL/0304/2006 de la Comunidad de Madrid y RECAVA-RD06/0014/1012 del Instituto de Salud Carlos III.

Sara González García ha sido financiada mediante una beca predoctoral del programa de FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación y un contrato de Titulado Superior de Actividades Científicas del Ministerio de Ciencia e Innovación, con financiación de los proyectos BFU2007-60990 y PLE2009-0110.

El CBMSO recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.





A mi padre,  
techo, bajo el que siempre encuentro cobijo.

A mi madre,  
ángel de mi guarda.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar he de agradecer a mi Directora, Marisa Toribio, por la confianza que ha depositado en mí, por darme la oportunidad de descubrir la ciencia y por guiarme en tantas ocasiones. Gracias, he aprendido muchísimo, profesional y personalmente.

A los mejores compis que no del planeta, sino del universo. Chic@s, SOIS GENIALES!! Marina, gracias por enseñarme siempre el buen hacer, por ser la fuente de sabiduría a la que recurrir y siempre obtener respuesta, o consuelo...¡y por estar siempre dispuesta al alterne! Kike, gracias por estar siempre ahí, por ser el hombro sobre el que apoyarse o echar la lagrimilla si era necesario, por tener ese sexto sentido para saber cuando algo va mal. ¡Y por hacernos bola! Patri, gracias por tener siempre ese humor que nos alegra cada día, por enseñarme tantas cosas y apoyarme en los momentos más difíciles y ¡porque no nos quiten esos tercios! Juan, ¡ay! ¡Que sería de nosotros sin ti! Gracias por estar siempre dispuesto a echar un cable y hacerlo siempre de buena gana, por ser tan divertido...¡y por ponernos esas fotos y vídeos que nos amenizan el día! Ah, ¡nunca olvidaré tus reanimaciones a lo croqueta! Chus, que eres una crack y nos dejas boquiabiertos tantas veces...tanto científica como artísticamente...y “*as usual*”...¡tu timer esta pitando y no te enteras!...pipipi pipipi... Martita! Estoy segura de conseguirás que todo salga adelante, has tenido que enfrentarte a muchas cosas y aquí sigues. Gracias por tener ese pedazo de corazón y entenderme en tantas cosas. Tere y Paloma, chicas gracias por estar siempre dispuestas a ayudar. Olga, gracias por ponerle tantas ganas, no pierdas la ilusión nunca.

¡Espero que nunca cambiéis y sigáis haciendo que el 222 sea como una familia!

Y al resto de miembros de la familia que fueron en busca de nuevos horizontes, gracias por tantos buenos momentos: María, pedazo de trabajadora y compañera, ¡vuelve pronto!; Sara, tocaya, ¡que sigan esas conversaciones de puesta al día en la fuente!; Tizi, bambina, gracias por ser tan divertida a pesar de todo... y much@s más: Ángel, Gretel, Almudena y sus chicas, Elena.

A todos los demás que han hecho posible este trabajo y me han facilitado siempre las cosas, aunque sólo fuese con un hola y una sonrisa por el pasillo o en cultivos: los Balbinos (Aldo, Elena, Nuria, Hisse, María, Enrique, Raquel y todos los demás ¡sois tantos!), a los MAL (o ex-MAL, Olga, JuanFra, ....), a los López de Castro, Berta, Silvia, Yolanda y un largo etcétera.

Y ya fuera de lo profesional, a mi familia, en especial a mi tía Luisa y a mis abuelitos que me estarán viendo desde alguna parte, gracias por sentirnos siempre tan orgullosos de mí, por enseñarme la vida y cuidarme tantas veces. Os quiero.

A Maribel, por ser tan buena siempre conmigo y cuidarme tanto, y por contarme tantas historias divertidas. Gracias, te quiero mucho.

A mis dos chicas preferidas, Cris y María, que sois de lo mejor que hay, que os quiero muchísimo y que os agradezco todo vuestro apoyo, siempre. Espero que sigamos compartiendo tantas cosas. Por supuesto, Alfredo y Rubén, ¡sois geniales! A ver si nos vemos...

A mis otras chicas de la Universidad, María (de Madrid, para no liarnos), Estrella, Anita y bueno Ángel, que tu eres casi una más...Os quiero un montón, gracias por alegrarme tantas veces y por ayudarme otras tantas. Amol, que habría sido de mí si no me hubieses animado a hacer la tesis, aún sabiendo tan de cerca dónde me estaba metiendo, gracias por tus buenos consejos y por estar siempre pendiente de mí, ¡aún desde Gütenlandia! Y a todos con los que compartí tantas horas de clase, y de juerga...: Sara, Nines, Raquel, Cris, etc.

A mis compis de danza de la panza, Almu, María, Sara, Tere, Itziar, sois estupendas, gracias por hacerlo todo tan divertido y por esos nervios entre bambalinas. Yamila, gracias por tu arte. ¡Venga esos *shimmis*!

A mi padre, por enseñarme a trabajar duro, a no darme por vencida, por tener siempre un buen consejo aunque muchas veces lo desoiga y por apoyarme en todo momento. Te quiero muchísimo.

A Jon, por tu infinita paciencia cuando me vengo abajo, cuando me pongo nerviosa o por el paper, o por la tesis o siempre por algo, por escuchar mis historias de Notch y la interleuquina-7...como estás tan loquito, creo que en el fondo te gustaba imaginártelas de verdad. Gracias por ser mi amigo, y mi compañero. Te quiero.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	11
ABREVIATURAS.....	14
SUMMARY.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T.....	19
2. La vía de señalización Notch.....	22
2.1. Estructura de los receptores Notch .....	22
2.2. Ligandos de Notch y activación de la vía.....	23
2.3. Función de Notch en el desarrollo temprano de los linfocitos T.....	26
2.4. Función de Notch en el desarrollo tardío de los linfocitos T.....	29
3. Función de la interleuquina 7 en la diferenciación de los linfocitos T.....	31
3.1. La IL-7 en el desarrollo T temprano de los linfocitos T .....	31
3.2. La vía de señalización IL-7/ IL-7R.....	32
3.3. Polimorfismos de la cadena IL-7R $\alpha$ .....	34
4. Leucemias T linfoblásticas agudas .....	35
4.1. La función oncogénica de Notch1.....	35
4.2. Implicación de la vía de IL-7R .....	38
OBJETIVOS .....	39
MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
RESULTADOS .....	59
1. Notch1 regula la expresión de IL-7R y la expansión de los progenitores de los linfocitos T en el desarrollo intratímico .....	61
1.1. La señalización a través de Notch1 induce la expresión de IL-7R $\alpha$ en precursores hematopoyéticos .....	61
1.2. La regulación de la expresión del IL-7R $\alpha$ inducida por Notch1 es específica del linaje celular T.....	63
1.3. IL7R es una diana transcripcional directa de Notch1 .....	65
1.4. Notch1 regula la expansión dependiente de IL-7 de los progenitores intratímicos humanos.....	68
1.5. La señalización por IL-7R es suficiente para mantener la proliferación de los precursores T en ausencia de Notch1.....	72

<b>2. Expresión y función del receptor de IL-7 en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL)</b>	<b>76</b>
2.1. Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$ en la T-ALL	76
2.2. La señalización por IL-7R rescata la proliferación de las células T-ALL con Notch inactivo	78
2.3. Las T-ALLs expresan receptores de IL-7 funcionales	78
2.4. Implicación funcional de IL-7R en la supervivencia y proliferación de las T-ALLs	80
2.5. La expresión y función de IL-7R $\alpha$ son necesarias para la proliferación de las pre-B-ALLs	83
2.6. El IL-7R contribuye a la oncogénesis <i>in vivo</i> de las leucemias linfoblásticas agudas de origen T y B	85
2.7. Activación constitutiva de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK asociadas al IL-7R en células T-ALL	90
2.8. El silenciamiento del IL-7R en T-ALLs bloquea la activación basal de ERK1/2	94
2.9. Activación constitutiva de la vía MAPK/ERK en T-ALLs primarias que expresan IL-7R	95
2.10. Identificación de polimorfismos de un único nucleótido en el gen <i>IL7R</i> de las T-ALLs	96
2.11. Los SNPs de <i>IL7R</i> no dotan de ninguna característica diferencial a los IL-7Rs de las T-ALLs	99
<b>3. La señalización vía IL-7R induce la activación de Notch1 dependiente de ADAMs y ERK en T-ALLs</b>	<b>101</b>
3.1. La activación vía IL-7R aumenta los niveles endógenos de ICN1 en T-ALLs	101
3.2. La activación de Notch1 inducida vía IL-7R es dependiente de ERK1/2	102
3.3. La señalización vía IL-7/IL-7R incrementa la actividad basal de ADAMs de manera dependiente de ERK	103
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>145</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## Página

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Modelo propuesto de diferenciación linfoide y mieloide en el timo humano y el papel de la señalización por Notch1 en este proceso.....	21
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del desarrollo T humano.....	22
<b>Figura 3.</b> Estructura (A) y vía de señalización (B) de los receptores Notch.....	25
<b>Figura 4.</b> Diagrama del modelo actual propuesto de diferenciación hematopoyética a partir de células madre multipotenciales LT-HSC.....	27
<b>Figura 5.</b> Papel de Notch en las decisiones de linaje durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo y su activación en periferia por células presentadoras de antígeno.....	30
<b>Figura 6.</b> Esquema de la vía de señalización del receptor de IL-7.....	33

### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 1.</b> Relación de líneas celulares utilizadas en este estudio.....	45
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos primarios utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo.....	48
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos secundarios utilizados para citometría de flujo y <i>Western Blot</i> .....	49
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos de RT-PCR y para el clonaje del ADNc de IL-7R $\alpha$ humano y de su promotor.....	53
<b>Tabla 5.</b> Sondas TaqMan (Applied Biosystems) utilizadas para los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real.....	54
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos primarios utilizados para ensayos de <i>Western Blot</i> .....	55

### RESULTADOS

<b>Figura 7.</b> La señalización por Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$ en precursores hematopoyéticos.....	62
<b>Figura 8.</b> La inhibición de la señalización por Notch mediante dnMAML-1 impide la transcripción del <i>IL7R</i> en células del linaje T.....	64
<b>Figura 9.</b> La inactivación de Notch reduce la expresión del <i>IL7R</i> selectivamente en el linaje T.....	65
<b>Figura 10.</b> Notch regula la transcripción del <i>IL7R</i> a través del complejo CSL/MAML-1.....	67

<b>Figura 11.</b> Regulación de la expresión génica durante el desarrollo temprano de los linfocitos T humanos.....	69
<b>Figura 12.</b> La inhibición de Notch mediante dnMAML-1 disminuye la expresión de IL-7R $\alpha$ y bloquea la expansión de los progenitores DN durante el desarrollo T humano.....	70
<b>Figura 13.</b> Notch1 es dispensable para la diferenciación temprana de los progenitores comprometidos al linaje T.....	71
<b>Figura 14.</b> La inhibición de la señalización a través de Notch1 bloquea el proceso de selección $\beta$ durante la diferenciación intratímica humana.....	72
<b>Figura 15.</b> La expresión ectópica de IL-7R $\alpha$ rescata la proliferación de timocitos DN con la vía de Notch inactiva, pero no sustituye a Notch durante la selección $\beta$ .....	73
<b>Figura 16.</b> La expresión ectópica de IL-7R $\alpha$ rescata la proliferación de timocitos DN en ausencia de Notch pero no la supervivencia celular durante la selección $\beta$ .....	74
<b>Tabla 7.</b> Características fenotípicas y moleculares de las líneas celulares de T-ALL utilizadas en este estudio.....	77
<b>Figura 17.</b> Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$ en T-ALLs.....	77
<b>Figura 18.</b> La activación de la vía IL-7/IL-7R rescata el defecto en proliferación de las T-ALLs causado por la inhibición de la señalización a través de Notch.....	79
<b>Figura 19.</b> Las T-ALLs expresan IL-7Rs funcionales.....	80
<b>Figura 20.</b> Silenciamiento de la expresión de IL-7R $\alpha$ en T-ALLs.....	81
<b>Figura 21.</b> El silenciamiento de IL-7R $\alpha$ reduce la proliferación y viabilidad celular de las T-ALLs IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> .....	83
<b>Figura 22.</b> La inhibición de la expresión de IL-7R $\alpha$ induce la apoptosis y detiene el ciclo celular de T-ALLs.....	84
<b>Figura 23.</b> Las leucemias pre-B ALL son dependientes de la expresión del IL-7R para su mantenimiento <i>in vitro</i> .....	85
<b>Figura 24.</b> La expresión del IL-7R es necesaria para el desarrollo tumoral de las T-ALLs <i>in vivo</i> .....	86
<b>Figura 25.</b> El silenciamiento de la expresión de IL-7R $\alpha$ reduce la capacidad oncogénica <i>in vivo</i> de leucemias linfoblásticas humanas de origen pre-B.....	88
<b>Figura 26.</b> Los tumores generados <i>in vivo</i> a partir de células JURKAT expresan el IL-7R y el silenciamiento de IL-7R $\alpha$ afecta a su capacidad de crecimiento.....	89
<b>Figura 27.</b> Las T-ALLs no transcriben IL-7 ni TSLP de forma autocrina.....	90



<b>Figura 28.</b> Las vías de señalización JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2 se encuentran activadas constitutivamente en células T-ALLs.....	91
<b>Figura 29.</b> Análisis de la especificidad de los inhibidores de JAK y MEK en células T-ALLs activadas con IL-7.....	92
<b>Figura 30.</b> Análisis de la especificidad de los inhibidores de JAK, MEK y PI3K sobre la activación basal de las vías STAT5, PI3K y ERK1/2.....	92
<b>Figura 31.</b> Efecto de los inhibidores de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK sobre el ciclo celular y la viabilidad de las T-ALLs.....	93
<b>Figura 32.</b> El silenciamiento de IL-7R $\alpha$ en T-ALLs reduce los niveles basales de P.ERK1/2 y de BCL2.....	94
<b>Figura 33.</b> Las T-ALLs primarias expresan el IL-7R y poseen una activación basal constitutiva de ERK1/2 .....	96
<b>Figura 34.</b> Las T-ALLs expresan transcritos de diferente tamaño del <i>IL7R</i> que poseen SNPs.....	97
<b>Figura 35.</b> Esquema de los SNPs identificados en la región codificante del <i>IL7R</i> humano (NM_002185.2).....	98
<b>Tabla 8.</b> Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) hallados en la secuenciación del <i>IL7R</i> de muestras primarias de T-ALL y líneas celulares derivadas de T-ALLs.....	98
<b>Figura 36.</b> Los SNPs del <i>IL7R</i> no confieren una ventaja proliferativa.....	100
<b>Figura 37.</b> La señalización por IL-7R incrementa los niveles de ICN1 en T-ALLs.....	102
<b>Figura 38.</b> La señalización a través del IL-7R incrementa los niveles de ICN1 vía ERK1/2.....	103
<b>Figura 39.</b> La señalización vía IL-7R induce la activación de ADAMs dependiente de ERK.....	104

## DISCUSIÓN

<b>Figura 40.</b> Modelo hipotético de relación entre las vías de Notch1 e IL-7R.....	121
---	-----

## **ABREVIATURAS**

En este trabajo hemos respetado las abreviaturas en inglés de muchos términos para facilitar su lectura junto con otros textos científicos.

**4ISP:** CD4 simples positivas inmaduras (*CD4 immature simple positive*)  
**7-AAD:** 7-Amino-actinomicina D  
**ADAM:** *A Disintegrin And Metalloproteinase*  
**ADNc:** ácido dexosirribonucleico complementario  
**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero  
**ANK:** repeticiones tipo anquirina (*Ankyrin repeats*)  
**APC:** Aloficocianina (*Allophycocyanin*)  
**B-ALL:** leucemia B linfoblástica aguda (*B-Acute Lymphoblastic Leukemia*)  
**CB:** sangre de cordón umbilical (*Cord Blood*)  
**CLP:** progenitor linfoide común (*Common Lymphoid Progenitor*)  
**CTL:** linfocitos T citotóxicos (*Citotoxic T Lymphocytes*)  
**DL:** Delta-like (1,3,4)  
**DN:** doble negativa (CD4-CD8-)  
**dnMAML-1:** dominante negativo MAML-1 (*Dominant Negative Mastermind-like 1*)  
**DP:** doble positiva (CD4+CD8+)  
**ETP:** progenitor tímico temprano (*Early Thymic Progenitor*)  
**FBS:** suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)  
**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblasts Growth Factor*)  
**FITC:** isotiocianato de fluoresceína (*Flourescein-isotiocianato*)  
**Flt3l:** ligando del receptor Flt3 (*Flt3 Ligand*)  
**FTOC:** cultivo organotípico de timo fetal (*Fetal Thymic Organ Culture*)  
**γc:** cadena gamma común (*Gamma common*)  
**GFP:** proteína verde fluorescente (*Green Flourescent Protein*)  
**GSI:** inhibidor de gamma secretasa (*Gamma Secretase Inhibitor*)  
**HBSS:** *Hanks Balanced Salt Solution*  
**HSC:** célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*)  
**ICN1:** dominio intracelular de Notch1 (*IntraCellular Notch1*)  
**IL-1RII:** receptor tipo II de interleuquina 1 (*IL-1 Receptor II*)  
**IL-7:** Interleuquina 7  
**IL-7R:** Receptor de interleuquina 7  
**IL-7Rα:** cadena alfa del receptor de interleuquina 7.  
**IPCr:** inmunoprecipitación de cromatina  
**IU:** unidades internacionales (*International Units*)  
**Kb:** kilobase  
**KDa:** kilodalton

**Lin-:** ausencia de marcadores de linaje, ej: CD19-, CD3-, CD13-, etc.

**MFI:** media de la intensidad de fluorescencia (*Mean of Fluorescence Intensity*)

**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

**NGF:** factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*)

**NK:** células asesinas naturales (*Natural Killer*)

**pb:** pares de bases

**PBS:** tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PE:** ficoeritrina (*Phycoerithrin*)

**PEST:** secuencia P-E-S-T de Notch

**PI3K:** fosfoinositol-3 quinasa (*Phosphoinositol-3 Kinase*)

**PMA:** 13-acetato de forbol 12-miristato

**pTα:** cadena alfa del pre-TCR

**RAM:** módulo de asociación a RBP-Jk (*RBP-Jk association module*)

**rh:** recombinante humana

**SCID:** inmunodeficiencia severa combinada (*Severe Combined Immunodeficiency*)

**SEM:** error standard de la media (*Standard Error of the Mean*)

**shRNA:** horquilla de ARN (*short hairpin RNA*)

**SNP:** polimorfismo de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polimorphism*)

**SOCS:** supresor de la señalización por citoquinas (*Suppressor of Cytokine Signaling*)

**SP:** simple positiva

**T-ALL:** leucemia T linfoblástica aguda (*T-Acute Lymphoblastic Leukemia*)

**TACE:** enzima convertora de TNF-α (*TNF-α Converting Enzyme*)

**TCR:** receptor de antígenos de células T (*T Cell Receptor*)

**TECs:** células epiteliales tímicas (*Thymic Epithelial Cells*)

**TGF-α:** factor de crecimiento de tumores alfa (*Tumor Growth Factor alpha*)

**Th:** células T colaboradoras (*T helper cells*)

**TM:** transmembrana

**TNFα:** factor necrosante de tumores alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

## **SUMMARY**

The development of T lymphocytes from hematopoietic stem cells within the thymus is a tightly regulated process guided by inductive signals provided by the thymic microenvironment. Among these signals are those provided by interaction between the Notch1 receptor and its Delta-like ligands expressed on the surface of thymic epithelial cells. This interaction is an initial obligatory event for the earliest lymphomyeloid progenitors seeding the thymus to enter the T-cell differentiation program. Once a progenitor commits to the T-cell lineage, its proliferation and survival is highly dependent on growth signals derived from the interleukin 7 receptor (IL-7R). The mechanism responsible for the dynamic- and lineage-specific expression of IL-7R during thymopoiesis remained unknown, although different transcription factors, such PU.1 and GABP $\alpha$ , were found to regulate expression of the gene encoding the IL-7R alpha chain (*IL7R*) during B-cell development, and the later also regulates *IL7R* transcription in mature T-cells.

In this study we show that Notch1 signaling is responsible for the stage- and lineage-specific expression of IL-7R $\alpha$  during human intrathymic T-cell development, thus controlling the IL-7-dependent expansion of the T-cell progenitor pool prior to  $\beta$ -selection maturation stage. We also demonstrate that Notch dependent regulation of IL-7R $\alpha$  expression is common to T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL), where activating mutations of Notch1 are found in more than 60% of the patients. Because IL-7R signaling was found to rescue cell proliferation in Notch-deprived T-ALLs, next we addressed the contribution of IL-7R to T-ALL oncogenesis. We show that expression of IL-7R $\alpha$  is necessary to support not only T- but also pre-B-ALL proliferation *in vitro*. More importantly, it is critically required for tumor development of ALLs *in vivo*. Although no oncogenic mutations were identified in *IL7R* that supported the observed IL-7R dependency of ALLs, this can be explained by the existence of a positive feed-back loop between IL-7R and Notch signaling pathways. In fact, IL-7R is able to promote Notch1 activation by inducing ADAM metalloproteases function in an ERK1/2-dependent fashion.

In summary, we describe a new cross-regulation between the two main pathways implicated in T-cell development, which are also activated in T-ALLs, opening new opportunities for the design of targeted therapies against this type of cancer.

# ***INTRODUCCIÓN***

INTRODUCCIÓN



El sistema hematopoyético de los mamíferos produce billones de células sanguíneas maduras cada día en respuesta a la demanda fisiológica del organismo. Las células madre o tronco hematopoyéticas (HSCs; del inglés, *Hematopoietic Stem Cells*), residentes en la médula ósea, son las responsables últimas de mantener la producción duradera de nuevas células sanguíneas, gracias a su potencialidad de generar todos los linajes sanguíneos y a su extensa capacidad de autorrenovación. Todas las células sanguíneas (mieloides, linfoides y eritroides), excepto los linfocitos T, se generan *in situ* en la médula ósea a partir de estas células madre, en un proceso caracterizado por la pérdida progresiva de potencialidad hacia otros tipos celulares y a la activación de programas transcripcionales específicos de cada linaje particular, que en último lugar definirán la función de la célula sanguínea madura.

Los linfocitos T, sin embargo, se desarrollan en un órgano especializado, el timo, a partir de precursores derivados de las HSCs y que han perdido la capacidad de autorrenovación, que migran desde la médula ósea o desde el hígado, en el adulto y el embrión, respectivamente. Una vez en el timo, estos precursores encontrarán un microambiente único, constituido principalmente por las células epiteliales del estroma tímico (TECs; del inglés, *Thymic Epithelial Cells*), caracterizado por la expresión de moléculas de membrana y la producción de factores de crecimiento solubles, cuyas señales son necesarias para la correcta diferenciación de las células T maduras (Anderson *et al.*, 2007; Bhandoola *et al.*, 2007; Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2007; Heinzl *et al.*, 2007; Maillard *et al.*, 2005; Rothenberg, 2007). Por tanto, el timo requiere un flujo continuo y periódico de progenitores que viajan por la circulación sanguínea desde la médula ósea. Estos progenitores se irán diferenciando a través de una serie de estadios madurativos, gracias a las señales proporcionadas por las células estromales, siendo cruciales para este fenómeno la señalización a través de los receptores Notch (Pui *et al.*, 1999 y Radtke *et al.*, 1999) y del receptor de interleuquina 7 (IL-7R) (Shortman *et al.*, 1990 y Sudo *et al.*, 1993), entre otros.

## 1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T.

La identidad de la población celular inmigrante al timo ha sido objeto de debate durante los últimos años, principalmente porque representan una población minoritaria, ya que sólo unas pocas células son requeridas para la generación eficiente de los linfocitos T (Shortman y Wu, 1996). Recientemente, estudios fenotípicos y funcionales de diferentes grupos han concluido que el timo postnatal

adulto, tanto humano como de ratón, es alimentado por progenitores caracterizados por la expresión de las proteínas de membrana c-kit y Flt3 y la expresión casi indetectable del IL-7R, siendo definidos por tanto como c-kit<sup>+</sup> Flt3<sup>+</sup> IL-7R<sup>-low</sup> (Allman *et al.*, 2003; García-Peydró *et al.*, 2006; Porritt *et al.*, 2004). Este progenitor inmaduro temprano o ETP (del inglés, *Early thymic progenitor*) representa un 0,01-0,03% del total de las células del timo neonatal y se incluye en el estadio 1 de la fracción denominada doble negativa (DN1), ya que carece de la expresión de los antígenos CD4 y CD8, caracterizado por el fenotipo CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> en humanos (García-Peydró *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 1995) y CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en ratón (Shortman y Wu, 1996). Dichos ETPs son progenitores linfomieloides que poseen la capacidad de generar células NK (del inglés, *Natural Killer*), células mieloides, como macrófagos y células dendríticas, colonias mixtas granulo-monocíticas (GM) e incluso poseen potencial residual de generación de linfocitos B (Ardavin *et al.*, 1993; Bell y Bhandoola, 2008; de Yébenes *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 1995, 1998; Res *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1994; Wada *et al.*, 2008), además de linfocitos T (**Figura 1**). En humanos, la diferenciación intratímica de los ETPs implica una separación temprana de dos vías alternativas de diferenciación, a través de dos progenitores independientes, uno mieloide y otro linfoide. Estos progenitores son diferenciables gracias al aumento de los niveles de CD44 y la expresión exclusiva del receptor de GM-CSF (del inglés, *Granulo-Monocyte-Colony-Stimulating Factor*) en el caso del progenitor mieloide, o a la disminución de CD44 y la expresión del IL-7R, en el caso del progenitor linfoide. La transición al estadio DN2 (o pre-T) (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en ratón) (**Figura 2**) implica la pérdida del potencial mieloide y NK y define el compromiso final hacia el linaje T, caracterizado por la adquisición del marcador CD1a en humanos (Galy *et al.*, 1993). Posteriormente, los timocitos DN2 progresan hacia el estadio DN3, en el cual las células adquieren la expresión prematura del marcador CD4 en humanos (Kraft *et al.*, 1993), denominándose células CD4 simples positivas inmaduras o CD4ISP (del inglés, *CD4 Immature Single Positive*), siendo CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> en ratón. En los estadios DN1 a DN3, tiene lugar una extensa proliferación dependiente de la activación del IL-7R (Shortman *et al.*, 1990), pero en el estadio DN3 estas rondas de proliferación finalizan y comienzan los reordenamientos en los *loci* de las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$  del receptor de antígenos de las células T o TCR (del inglés, *T Cell Receptor*) (Blom *et al.*, 1999; Ramiro *et al.*, 1996). Las células productoras de reordenamientos satisfactorios de TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  se diferenciarán hacia células TCR $\gamma\delta$ . Sin embargo, en aquellas en que se exprese una cadena funcional TCR $\beta$ , ésta se aso-



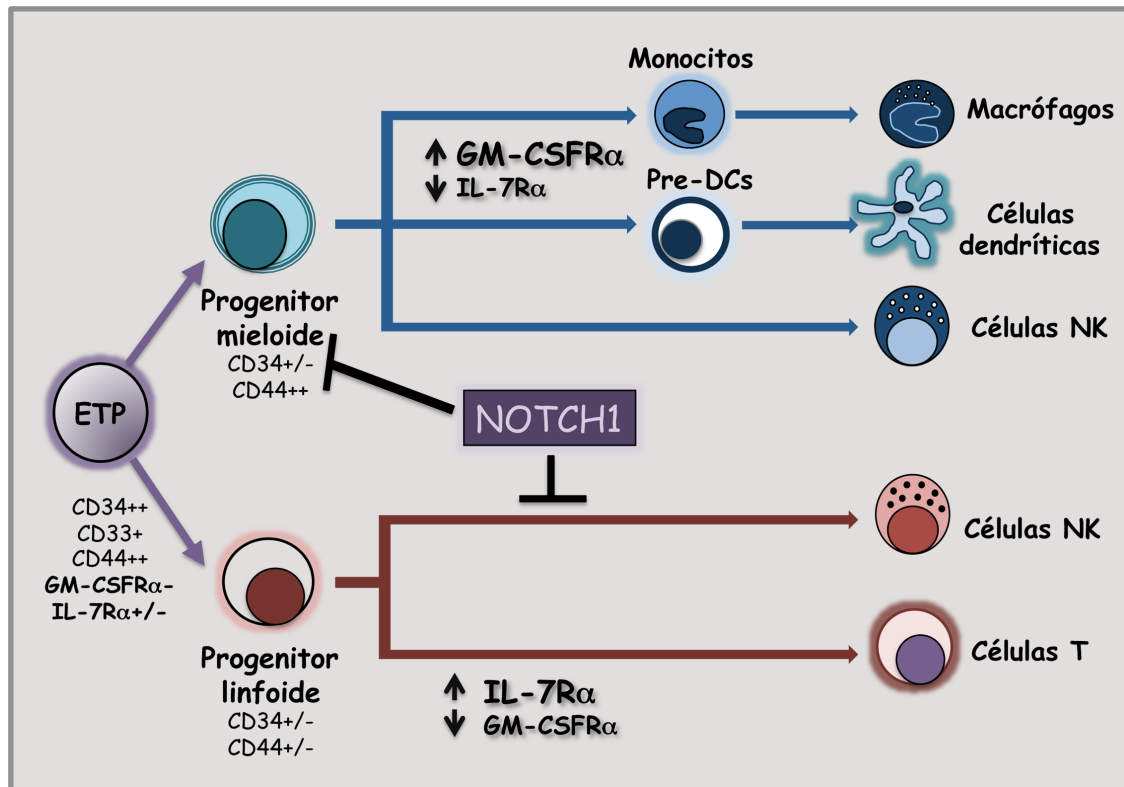


Figura 1. Modelo propuesto de diferenciación linfoides y mieloide en el timo humano y el papel de la señalización por Notch1 en este proceso (de Yébenes *et al.*, 2002; García-Peydró *et al.*, 2006).

ciará con la cadena invariante  $pT\alpha$  y los módulos del complejo CD3 ( $CD3\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ) para formar el complejo pre-TCR (Carrasco *et al.*, 2002; von Boehmer y Fehling, 1997). La señalización desde el complejo pre-TCR promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación hacia el estadio doble positivo  $CD4^+CD8^+$  (DP) (Carrasco *et al.*, 1999; Trigueros *et al.*, 1998). Este proceso, conocido como selección  $\beta$  (Hoffman *et al.*, 1996), implica una enorme expansión de timocitos DP, el comienzo de los reordenamientos en el *locus*  $TCR\alpha$  y la expresión final de un complejo  $TCR\alpha\beta$  maduro. Los timocitos DP  $TCR\alpha\beta^+$  sufrirán posteriormente los procesos de selección positiva y negativa, basados en la afinidad del reconocimiento del TCR de antígenos propios presentados por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés, *Major Histocompatibility Complex*), expresado por las TECs. Como resultado de este proceso, se generarán células simples positivas o SP (del inglés, *Simple Positive*)  $CD4^+$  o  $CD8^+$  (Blom y Spits, 2006), cuya maduración funcional viene marcada por la pérdida del marcador CD1a (Res *et al.*, 1997) y la migración a los órganos linfoides periféricos, donde participarán en la respuesta inmunológica frente a patógenos.

Existen, por tanto, dos puntos de control principales durante el desarrollo intratímico implicados en la enorme expansión que tiene lugar en el timo, y que son dependientes de la expresión del IL-7R y del pre-TCR.

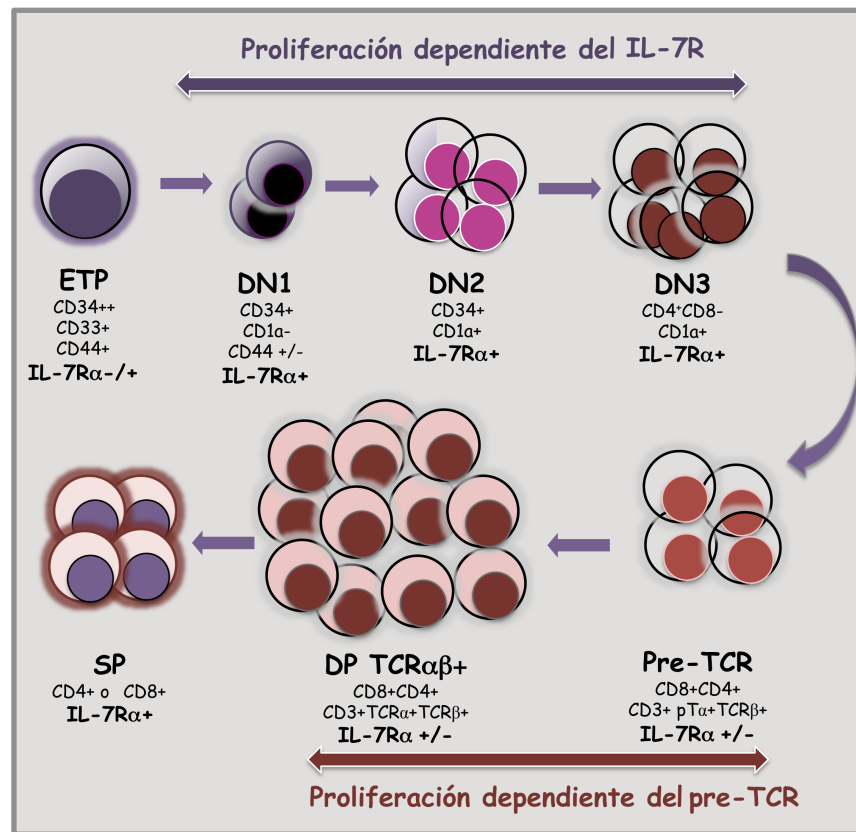


Figura 2. Representación esquemática del desarrollo T humano.

## 2. La vía de señalización Notch.

### 2.1. Estructura de los receptores Notch.

Los receptores Notch son una familia altamente conservada de receptores transmembrana (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999), formada por cuatro miembros en mamíferos (Notch1-4). El receptor es sintetizado como un precursor de 300 kDa y sufre una modificación postraduccional en el retículo endoplásmico, donde es glicosilado en residuos de O-fucosa por las enzimas *O-fucosyl transferasas*. Una vez abandona el retículo, el precursor sufre un primer corte proteolítico en el sitio S1 en la red *trans* del aparato de Golgi, mediado por una enzima convertasa tipo furina. Los fragmentos resultantes se asocian de forma no covalente formando un heterodímero maduro que es exportado hacia la superficie celular (Blaumueller *et al.*, 1997). El dominio extracelular de Notch está formado por 29-36 repeticiones del

tipo factor de crecimiento epidérmico o EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*) (Figura 3A), algunas de las cuales median la interacción con los ligandos de Notch; una región reguladora negativa (NRR; del inglés, *Negative Regulatory Region*) compuesta por 12 repeticiones tipo Lin (LNR; del inglés, *Lin Repeats*) y un dominio de heterodimerización (HD), responsable de la asociación estable del heterodímero y de su mantenimiento en una conformación inactiva en ausencia de ligando. El dominio intracelular está compuesto por un módulo de asociación al factor de transcripción RBP-J $\kappa$  o RAM (del inglés, *RBP-J $\kappa$  Association Module*), dos secuencias de localización nuclear o NLS (del inglés, *Nuclear Localization Sequence*), siete repeticiones tipo cdc10/anquirina (ANK) y un dominio de transactivación o TAD (del inglés, *Trans-activation Domain*), que contiene la secuencia PEST. El dominio RAM se requiere para la interacción con el factor CSL (CBF1/RBP-J $\kappa$  en mamíferos,  $\text{Su(H)}$  en *Drosophila* y  $\text{LAG-1}$  en *C. elegans*), a través del cual, Notch regula la transcripción de genes diana (revisión en Kopan e Ilagan, 2009). Las repeticiones ANK se asocian con co-activadores de la transcripción de la familia MAML (1-3) (del inglés, *Mastermind-like*), esenciales para la señalización por Notch (Nam *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2002). La secuencia PEST regula la estabilidad de la proteína, ya que es diana de ubiquitinización por las ligasas de ubiquitina Fbw7 y Sel10 y es necesaria para la degradación proteosomal y terminación de la señal de Notch (Oberg *et al.*, 2001).

## 2.2. Ligandos de Notch y activación de la vía.

Los receptores Notch reconocen ligandos canónicos de la familia tipo Delta (DL1, DL3, DL4; del inglés, *Delta-like*) o de la familia Jagged (Jag1 y Jag2) (D'Souza *et al.*, 2008) (Figura 3B), expresados en la superficie de las células vecinas. La afinidad de la interacción por el ligando puede ser modulada por glicosilación de los residuos O-fucosa embebidos en las repeticiones tipo EGF y está mediada por enzimas glicosil-transferasas de la familia Fringe, especialmente por *Lunatic Fringe* en el desarrollo T (Bruckner *et al.*, 2000). La interacción con los ligandos provoca un cambio conformacional en el receptor, exponiendo el sitio S2, diana del corte proteolítico por metaloproteasas de la matriz extracelular de la familia ADAM (del inglés, *A Disintegrin And a Metalloprotease*), específicamente por ADAM10 (o Kuzbanian) (van Tetering *et al.*, 2009) y ADAM17 (o TACE; del inglés, *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*) (Brou *et al.*, 2000). Este segundo corte proteolítico por ADAM conlleva la generación de una isoforma del receptor anclada a la membrana, que carece del dominio extracelular. Ambas metaloproteasas son capaces de activar la vía de Notch, pero el contexto en el que participa cada una de ellas, la existencia de

redundancia o la especificidad de tipo celular, está aún por establecer. Recientemente, un trabajo del grupo de Weinmaster ha demostrado que la actividad preferencial de estas enzimas sobre Notch podría depender de la presencia o no de ligando. Así, ADAM10 procesaría Notch en un contexto dependiente de ligando, mientras que ADAM17 sería la proteasa implicada en el corte proteolítico independiente de ligando, como puede ser el caso de las mutaciones del receptor Notch que carecen del dominio extracelular (Bozkulak y Weinmaster, 2009). La actividad de ADAM se regula transcripcionalmente, aunque existen claras evidencias de una activación postraducciona. Algunos autores han descrito que factores inductores del *shedding* o liberación de la membrana de ectodominios, como son los ésteres de forbol o diferentes factores de crecimiento (TGF- $\alpha$ , NGF, FGF), que actúan vía MAPK/ERK1/2, inducen la fosforilación del dominio intracelular de ADAM17 (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003). Sin embargo, no existe consenso en cuanto a la identificación del residuo específico de fosforilación. Se ha descrito que la estimulación con ésteres de forbol o factores de crecimiento provoca la fosforilación del residuo Treonina 735 de ADAM17 y la sustitución de este residuo por una Alanina disminuye considerablemente la fosforilación (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002). En un estudio diferente, se halló que la fosforilación de ADAM17 ocurre en el residuo Serina 819 (Fan *et al.*, 2003). Ambos trabajos concluyen que la actividad basal de ADAM17 no se ve afectada por la modificación de estos residuos, en concordancia con estudios en los cuales la eliminación del dominio intracelular de ADAM17 no afectaba al *shedding* constitutivo de substratos como TNF- $\alpha$ , TNFR e IL-1RII (Reddy *et al.*, 2000). Por tanto, aunque la fosforilación del dominio citosólico de ADAM17 induce un aumento de su actividad, no parece ser necesaria para la activación basal de la proteína.

La isoforma de Notch procesada por ADAM es, a su vez, sustrato para un tercer corte proteolítico en el sitio S3, mediado por un complejo con actividad  $\gamma$ -secretasa, formado por las enzimas presenilina, A $\beta$ PH-1, nicastrina y PEN-2, que liberan de la membrana la porción intracelular de Notch (ICN o NICD; del inglés, *Intracellular Notch* o *Notch intracellular domain*, respectivamente). Esta porción ICN migra al núcleo y se asocia con el factor CSL. En estado inactivo, CSL se asocia a correpresores de la transcripción como SHARP/MINT/SPEN, mientras que en presencia de ICN este complejo es desplazado, a la vez que se recluta un complejo coactivador de deacetilasas y metilasas de histonas como p300/CBP y los factores MAML1-3 (revisión en Kopan e Ilagan, 2009). Este complejo es capaz de activar la transcripción de genes diana de la vía de Notch, entre los que se encuentran las

proteínas de la familia bHLH (del inglés, *basic-Helix-Loop-Helix*) Hey y Hes (Jarriault *et al.*, 1995); genes implicados en proliferación y supervivencia como c-myc (Weng *et al.*, 2006), ciclina D1 (Ronchini y Capobianco, 2001) y p21/Waf (Rangarajan *et al.*, 2001); además de CD25 (Adler *et al.*, 2003) y pT $\alpha$  (Reizis y Leder, 2002), que son dianas específicas de Notch en células T.

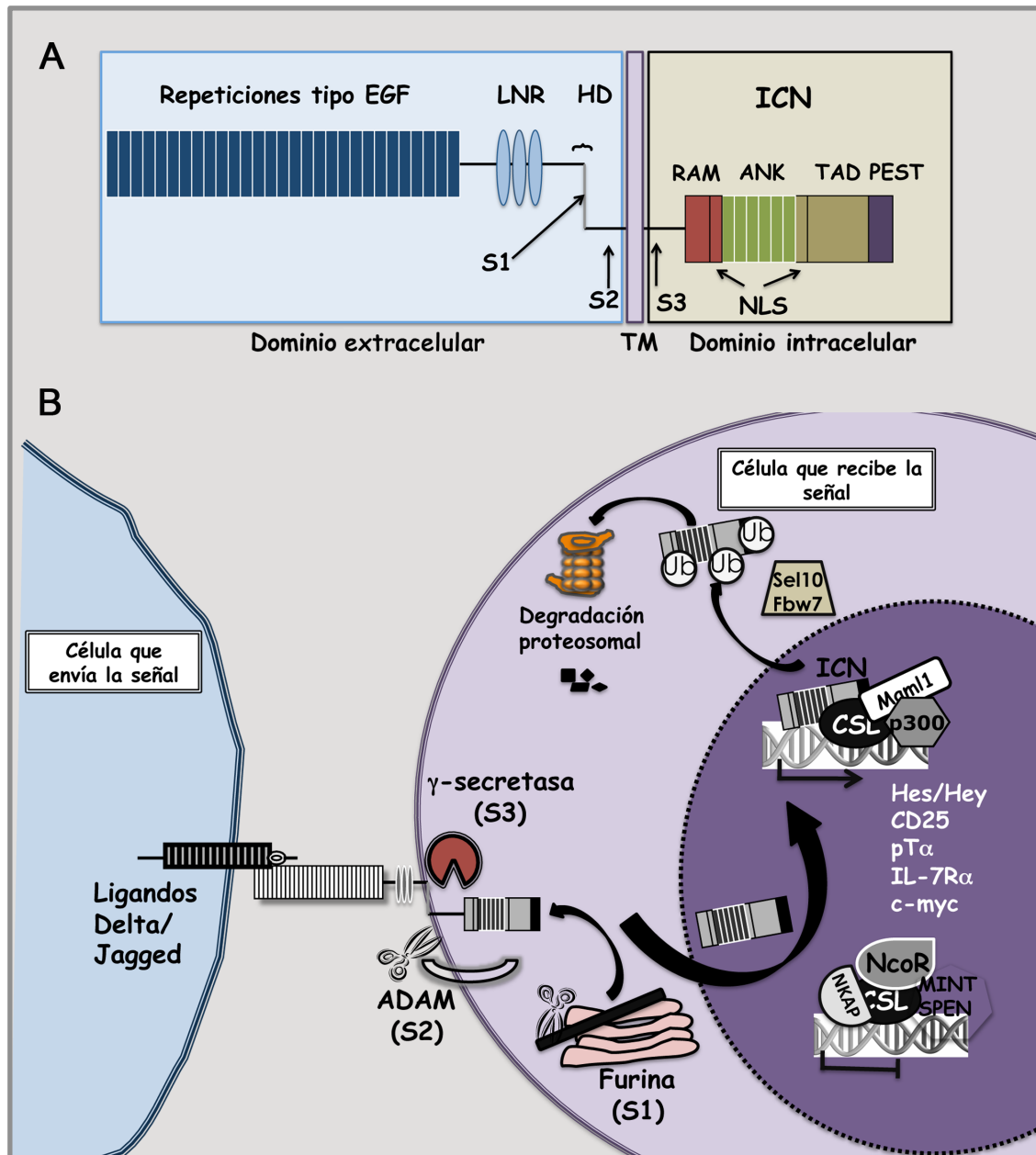


Figura 3. Estructura (A) y vía de señalización (B) de los receptores Notch.

### 2.3. Función de Notch en el desarrollo temprano de los linfocitos T.

El papel de los receptores Notch durante la diferenciación de los linfocitos T fue descrito inicialmente por Radtke y colaboradores (Radtke *et al.*, 1999), gracias a la generación de ratones deficientes en la expresión de Notch1 [Notch1<sup>(-/-)</sup>] en células T. Estos ratones mostraban una reducción de 5 veces en el número total de timocitos y un desarrollo anormal de la arquitectura cortical y medular del timo, cuando se comparaban con ratones no deficientes. El desarrollo T en ratones Notch1<sup>(-/-)</sup> queda bloqueado en un estadio inmaduro DN1 CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, a la vez que se produce un aumento aberrante en el número de células B B220<sup>+</sup> en el timo. Complementariamente a estos hallazgos, ensayos de ganancia de función utilizando ratones transgénicos para Notch1, demostraron que la expresión de Notch1 era suficiente para promover el desarrollo de células T fuera el timo (Pui *et al.*, 1999). Cuando las HSCs de médula ósea de ratón se modificaban genéticamente para expresar la forma constitutivamente activa de Notch1 (ICN1), y se transferían a ratones inmunodeprimidos, generaban una población anormal de células T DP TCRαβ<sup>+</sup> en la médula ósea, mientras que la generación de células B quedaba bloqueada. La conclusión de estos estudios fue que la señalización por Notch1 era crítica en la decisión de linaje T vs. B durante la hematopoyesis, dirigiendo al progenitor común linfoide T/B o CLP (del inglés, *Common Lymphoid Progenitor*) hacia el linaje T. Sin embargo, el concepto de CLP (Kondo *et al.*, 1997) ha cambiado con los años, reforzándose la idea de una relación mayor entre los linajes linfoide y mieloide (Adolfsson *et al.*, 2005; Kawamoto y Katsura, 2009) de lo que clásicamente se había propuesto (Akashi *et al.*, 2005). Los últimos hallazgos proponen que los progenitores linfomieloides multipotenciales incluyen los precursores T canónicos del timo postnatal (**Figura 4**). Por tanto, el papel inicial de Notch en la diferenciación T temprana ha sido examinado de nuevo.

En relación a la función de Notch en el desarrollo de los linfocitos T humanos, se ha demostrado que la activación de Notch1 en ETPs inducida tanto independientemente de ligando, mediante expresión ectópica de ICN1 (García-Peydró *et al.*, 2003; 2006), como tras la interacción con su ligando (De Smedt *et al.*, 2005; García-Peydró *et al.*, 2006), mediante un estroma de médula ósea que expresa constitutivamente el ligando Delta-like 1 (OP9-DL1) (Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002), impide la diferenciación de los ETPs en progenitores mieloides intermediarios, bloqueando la generación de células dendríticas y macrófagos. Así mismo, se inhibe la diferenciación de células NK desde el progenitor bipotencial T/NK (**Figura 1**). El bloqueo de linajes no-T por Notch1 promueve el desarrollo exclusivo de células T,

activándose un programa transcripcional específico (Bhandoola *et al.*, 2007; Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2007; Rothenberg, 2007), lo que refuerza la idea de un papel instructivo de Notch1 en el desarrollo linfoide T. Sin embargo, señales derivadas del estroma son requeridas constantemente además de Notch para promover un desarrollo completo de las células T. De hecho, los ETPs que sobreexpresan ICN1 son incapaces de llevar a cabo reordenamientos del *locus* del TCR y progresar más allá del estadio DN1, a no ser que se cultiven sobre células estromales (García-Peydró *et al.*, 2006). Sin embargo, estos progenitores ICN1<sup>+</sup> muestran una gran capacidad proliferativa, un efecto similar al que ocurre en las HSCs de cordón umbilical tras la activación de Notch (De Smedt *et al.*, 2002; Ohishi *et al.*, 2002). Por tanto, la señali-

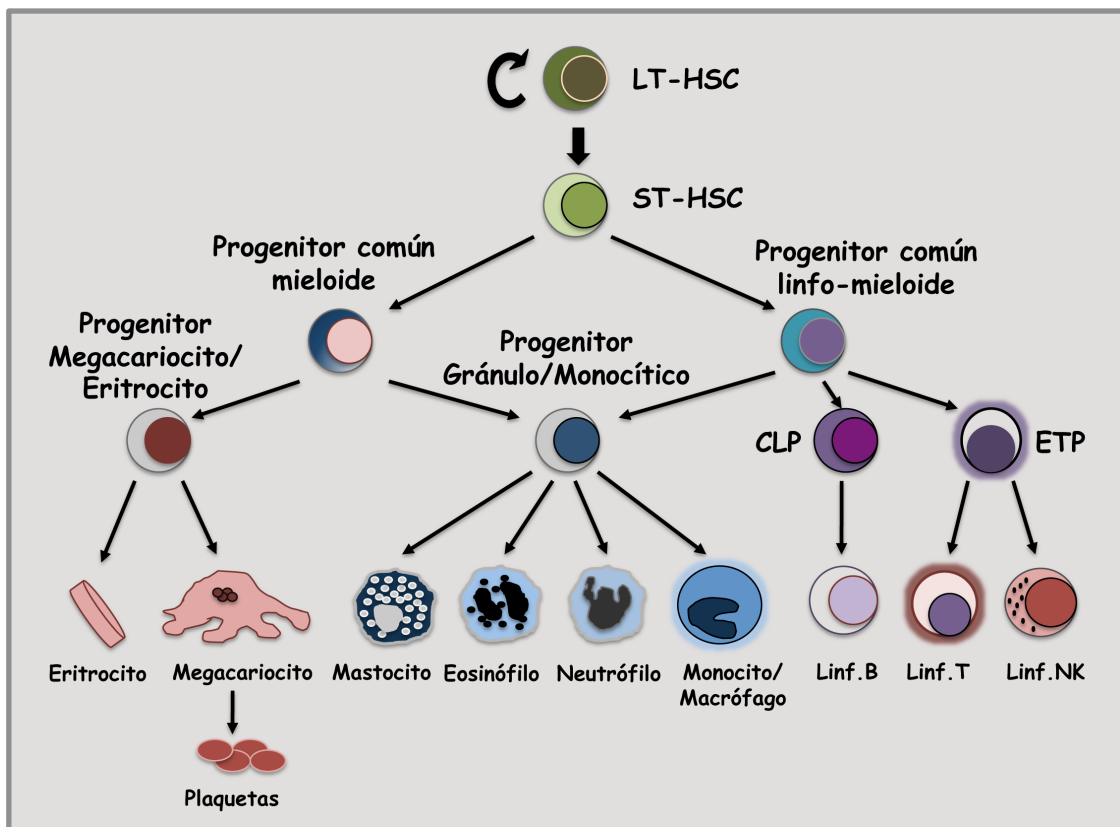


Figura 4. Diagrama del modelo actual propuesto de diferenciación hematopoyética a partir de células madre multipotenciales LT-HSC. LT-HSC, célula madre con capacidad de reconstitución a largo plazo; ST-HSC, células madre con capacidad de reconstitución a corto plazo; CLP, progenitor linfomieloide común; ETP, progenitor intratímico temprano.

zación por Notch parece clave para el mantenimiento y la proliferación de los progenitores hematopoyéticos, aunque hay que destacar que esta proliferación es dependiente de señales únicas proporcionadas por citoquinas y factores de crecimiento.



Los inhibidores de la actividad  $\gamma$ -secretasa o GSI (del inglés, *Gamma-secretase inhibitors*), compuestos farmacológicos que bloquean el corte proteolítico S3 de Notch (De Strooper *et al.*, 1999), han sido muy útiles para estudios *in vitro*. En estudios *in vivo*, la inhibición de Notch se ha podido abordar gracias a la generación de una isoforma dominante negativa del coactivador transcripcional de la ruta, MAML-1 (dnMAML-1), capaz de unirse al complejo CSL/Notch y bloquear su actividad transcripcional (Weng *et al.*, 2003). Estas estrategias han permitido corroborar que una de las funciones críticas de Notch1 es la amplificación del número de progenitores T tempranos en el timo (García-Peydró *et al.*, 2006; González-García *et al.*, 2009). Sin embargo, trabajos recientes *in vivo*, utilizando xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes, han descartado un papel fisiológico de Notch en el mantenimiento y expansión de las HSCs humanas (García-Peydró *et al.*, en preparación), tal y como había sido demostrado en ratón (Maillard *et al.*, 2008). Si las diferencias en la función proliferativa de Notch1 en HSCs y ETPs se deben al diseño experimental utilizado o reflejan una contribución diferencial de la vía de Notch en hematopoyesis, en condiciones homeostáticas o en condiciones de estrés hematopoyético, no ha sido aún esclarecido.

Los ensayos de pérdida de función han confirmado que la señalización por Notch es esencial para bloquear el desarrollo de los linajes no-T en el timo. Mediante el uso de cantidades decrecientes de GSI, se concluyó que la pérdida del potencial no-T inducida por Notch1 puede ser explicada en términos cuantitativos. Así, diferentes umbrales de señal de Notch1 suprimen secuencialmente los linajes B, mieloide y NK (De Smedt *et al.*, 2005). Además, los diferentes ligandos de Notch transmiten diferentes señales a los precursores T, afectando de manera distinta a su proliferación y/o potencial de diferenciación (Jaleco *et al.*, 2001; Lehar *et al.*, 2005), lo que sugiere que la expresión diferencial de ligandos podría ser responsable de diferentes umbrales de activación de Notch. Recientemente se ha demostrado que DL4 es el ligando fisiológico de Notch1 responsable de la diferenciación T en el timo (Koch *et al.*, 2008); por lo tanto, los mecanismos que controlen los niveles de expresión de DL4, o la expresión diferencial de distintos ligandos en el microambiente tímico, pueden ser los responsables del control cuantitativo de la señalización intratímica por Notch.

Se ha sugerido que las diferencias cuantitativas de las señales inducidas por Notch1 influyen también la decisión  $\text{TCR}\alpha\beta$  vs.  $\text{TCR}\gamma\delta$  (Figura 5), aunque los resultados son contradictorios en humanos o ratón. En ratón, el desarrollo de las células  $\text{TCR}\gamma\delta$  depende en menor grado de Notch que el de las células  $\text{TCR}\alpha\beta$ .



(Ciofani *et al.*, 2006; Garbe *et al.*, 2006; Washburn *et al.*, 1997). Por el contrario, la activación mantenida de Notch1 favorece la generación de células TCR $\gamma\delta$  a expensas de células TCR $\alpha\beta$  en cultivos organotípicos de timo fetal híbridos humano/ratón o FTOC (del inglés, *Fetal Thymic Organ Culture*) (García-Peydró *et al.*, 2003), resultado similar al obtenido en cultivos sobre estroma OP9-DL1 (Van de Walle *et al.*, 2009). Mientras que estos datos sugieren que se requiere una disminución temprana de la señal de Notch1 para el desarrollo de las células TCR $\alpha\beta$ , estudios recientes *in vivo*, utilizando xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes, demuestran que la señalización mantenida por ICN1 no afecta al desarrollo final de las células T (García-Peydró *et al.*, en preparación). Por tanto, la influencia de Notch1 en la decisión de linaje TCR $\alpha\beta$  vs. TCR $\gamma\delta$  permanece aún sin clarificar, aunque Notch1 se requiere de forma temprana para la diferenciación T de ambos linajes.

#### 2.4. Función de Notch en el desarrollo tardío de los linfocitos T.

Notch1 participa también en el proceso de selección  $\beta$ . Los ETPs humanos son incapaces de diferenciarse en células TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> maduras en ensayos de FTOC en los cuales la actividad de Notch se bloquea con GSI (De Smedt *et al.*, 2005; García-Peydró *et al.*, 2003) o en cultivos OP9-DL1 (García-Peydró *et al.*, 2006). En su lugar, se genera una población aberrante de células DP que carecen de la expresión en membrana de CD3 y de la expresión intracelular de la cadena TCR $\beta$ , equivalente a la observada en ratones Notch1<sup>(-/-)</sup> (Wolfer *et al.*, 2002). Así mismo, se generan altas frecuencias de células NK, dendríticas y monocitos. Por tanto, la actividad de Notch1 es necesaria, no sólo para bloquear la diferenciación no-T, sino también para completar el desarrollo T. Mientras que estos datos sugieren un papel de Notch1 en la inducción de reordenamientos de la cadena TCR $\beta$ , datos de Maillard y colaboradores implican a Notch1 en la proliferación y supervivencia de las células pre-T durante la selección  $\beta$  *in vivo* (Maillard *et al.*, 2006), de manera independiente del pre-TCR, lo que corrobora estudios previos *in vitro* (Ciofani *et al.*, 2004). Se cree, por tanto, que ambas vías Notch1 y pre-TCR cooperan durante la selección  $\beta$  para mantener la proliferación y la supervivencia de las células pre-T (Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2005; Taghon *et al.*, 2009), tanto en ratón como en humanos. Finalmente, aunque Notch1 se propuso inicialmente como un factor implicado en la decisión CD4 vs. CD8 durante la selección positiva, esta hipótesis se ha descartado al demostrarse que ratones condicionales deficientes en Notch1 no mostraban alteraciones en la generación de células SP (Wolfer *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha propuesto un

papel de Notch en la diferenciación de las células T colaboradoras CD4 hacia Th1 o Th2 (Figura 5) y en la polarización de células Th17. Así mismo, Notch se ha implicado en la activación y proliferación de las células T periféricas, induciendo la producción de citoquinas y la maduración de células vírgenes o *naïve* CD8<sup>+</sup> en linfocitos T citotóxicos (CTL) (Osborne y Minter, 2007). Aún así, la controversia en cuanto al papel de Notch1 en el desarrollo T permanece abierta, y más estudios, incluyendo aproximaciones genéticas en ratón para estudiar la deficiencia de los diferentes ligandos de Notch, así como la identificación de efectores críticos de la vía, son necesarios para alcanzar una conclusión final sobre el papel de la señalización por Notch1 en este proceso.

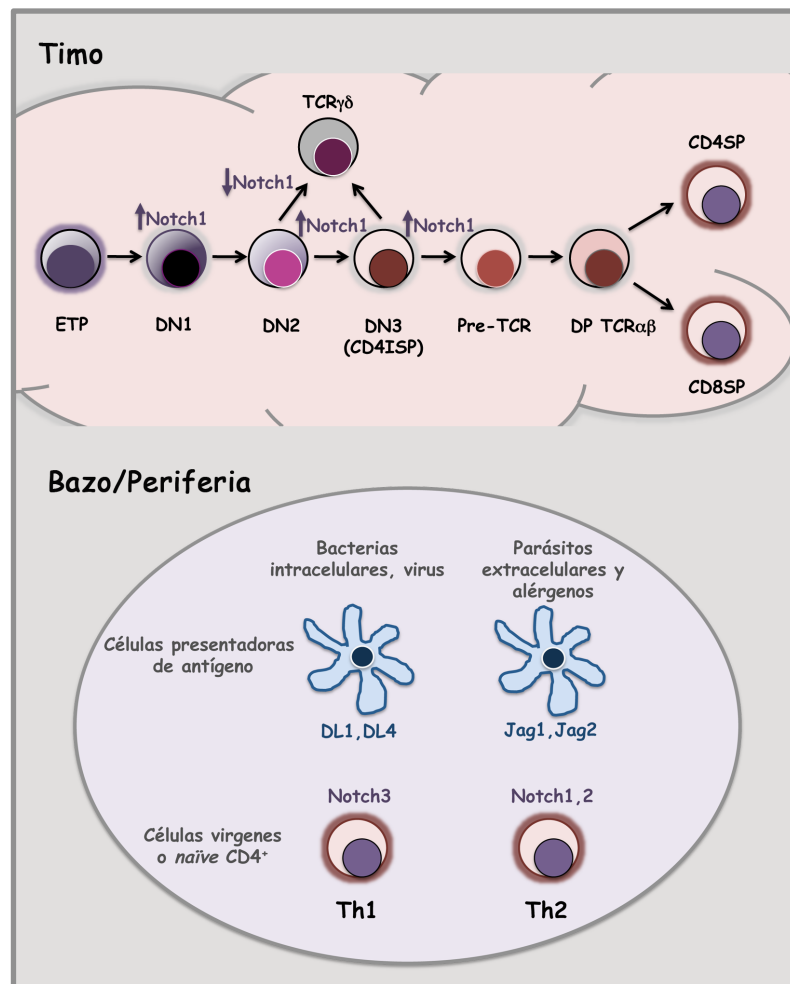


Figura 5. Papel de Notch en las decisiones de linaje durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo y su activación en periferia por células presentadoras de antígeno.

### 3. Función de la interleuquina 7 en la diferenciación de los linfocitos T.

#### 3.1. La IL-7 en el desarrollo temprano de los linfocitos T.

Como se ha descrito anteriormente, tras la entrada de los progenitores hematopoyéticos al timo tienen lugar dos fases de extensa proliferación, una antes y otra después de la inducción de los reordenamientos en el *locus* del TCR, ambas necesarias para obtener la abundante población de timocitos DP (Figura 2). La primera fase es críticamente dependiente y mediada por el receptor de alta afinidad para la interleuquina 7 (IL-7R) (Peschon *et al.*, 1994; Plum *et al.*, 1996; Puel *et al.*, 1998; Shortman *et al.*, 1990; Sudo *et al.*, 1993). La IL-7 es una citoquina de 25 KDa producida por las células del estroma de la médula ósea y del timo, que transmite señales de supervivencia y proliferación a las células B y T. La unión de la IL-7 a su receptor (Figura 6), compuesto por una cadena específica  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) asociada a la cadena  $\gamma$  común de receptores de citoquinas ( $\gamma c$ ) (Leonard, 2001), juega un papel no redundante en la diferenciación T. La IL-7 soporta la supervivencia y expansión de precursores T DN, aunque es prescindible tras el estadio DN3, donde es sustituida por la señalización del pre-TCR, recobrándose posteriormente su actividad tras el proceso de selección positiva (Munitic *et al.*, 2004; Van de Wiele *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004, 2006).

La función específica del estadio celular de la IL-7 durante el desarrollo intratímico se lleva a cabo mediante la regulación dinámica de la expresión y función del IL-7R (Munitic *et al.*, 2004). De los dos componentes del IL-7R, la cadena  $\gamma c$  es expresada constitutivamente en los precursores que alimentan el timo, mientras que la cadena IL-7R $\alpha$  es inducida en el estadio ETP y su expresión aumenta progresivamente hasta el estadio DN2/DN3 (Allman *et al.*, 2003; García-Peydró *et al.*, 2006; Porritt *et al.*, 2004). Posteriormente, la expresión del IL-7R disminuye regularmente y debe ser bloqueada entre la selección  $\beta$  y la selección positiva, para permitir la transición hacia el estadio DP (Van de Wiele *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004, 2006). Para garantizar la insensibilidad a la IL-7 en este periodo, la señalización desde el IL-7R es, además, bloqueada por los supresores de señalización de citoquinas o SOCS (del inglés, *Suppressor of Cytokine Signaling*) en timocitos DP previos a la selección, pero es recuperada tras la selección positiva (Yu *et al.*, 2006). Más aún, la disminución en los niveles del IL-7R durante el desarrollo T es necesaria para evitar una competición directa por la cantidad limitante de IL-7 producida en el

timo entre timocitos DN y DP (Munitic *et al.*, 2004). La restauración de la expresión en la membrana del IL-7R tras la selección positiva asegura la proliferación homeostática de las células T maduras periféricas derivadas de los timocitos CD4 y CD8 SP (Schluns *et al.*, 2000).

La regulación específica de linaje y de estadio madurativo de la función del IL-7R demanda la existencia de mecanismos estrictos que controlen su expresión. Se sabe que la transcripción del gen *Il7ra* durante el desarrollo linfoide temprano en ratón y en progenitores B de la médula ósea está regulada por el factor de transcripción de la familia Ets, PU.1 (DeKoter *et al.*, 2002). En el timo, PU.1 se expresa muy tempranamente en ETPs pero debe ser silenciado obligatoriamente para la progresión hacia el linaje T (Anderson *et al.*, 2002). En células T maduras, otro miembro de la familia Ets, GABP $\alpha$ , parece controlar la expresión de *Il7ra* (Xue *et al.*, 2004), aunque su implicación en el desarrollo temprano de los linfocitos T parece poco clara. GABP $\alpha$  coopera con PU.1 en el linaje B y regula la expresión de *Il7ra* en células pre-B y células B ya comprometidas (DeKoter *et al.*, 2007). Mientras estos datos apoyan la existencia de reguladores específicos durante el desarrollo B, la naturaleza de reguladores equivalentes en el desarrollo T ha permanecido como una cuestión abierta hasta el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, en el que se ha identificado a Notch1 como un regulador específico de la expresión de IL-7R $\alpha$  durante el desarrollo T temprano en humanos (González-García *et al.*, 2009).

### 3.2. La vía de señalización IL-7/ IL-7R.

En concordancia con un papel clave del IL-7R en la diferenciación T, la deficiencia en la expresión de IL-7R $\alpha$  resulta en el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada o SCID (del inglés, *Severe Combined Immunodeficiency Syndrome*) en humanos, caracterizado por una carencia total de células T. En ratón, sin embargo, ambos linajes T y B se ven severamente afectados en ausencia de IL-7R $\alpha$  (Leonard, 2001; Peschon *et al.*, 1994; Puel *et al.*, 1998; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995), indicando requerimientos diferenciales de la señalización a través del IL-7R entre humanos y ratón. La unión de IL-7 a su receptor conlleva la dimerización de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  en la superficie celular, activándose diferentes cascadas de señalización, entre las que se encuentran JAK/STAT, PI3K, ERK y Src quinasas (Figura 6). Estas vías promueven la transcripción de genes diana, que incluyen miembros de la familia de proteínas antiapoptóticas BCL-2, ciclina D1, SOCS-1, c-myc e IL-2R $\alpha$  (Barata *et al.*, 2005; Leonard, 2001). Entre ellos, la expresión de BCL-2 es suficiente

para rescatar el desarrollo T en ratones deficientes en IL-7R $\alpha$  (Akashi *et al.*, 1997; Maraskovsky *et al.*, 1997), pero no el desarrollo B (Maraskovsky *et al.*, 1998). Estos resultados apuntan hacia el mantenimiento de la supervivencia como la función más importante de la IL-7 durante el desarrollo de los linfocitos T, mientras que el IL-7R parece ser esencial en los procesos de reordenamiento de las inmunoglobulinas (Igs) en células pre-B (Bertolino *et al.*, 2005). La vía de PI3K es la principal vía implicada en la proliferación de los precursores T, mientras que la actividad de STAT5 se asocia a la diferenciación (Pallard *et al.*, 1999) y al control de los reordenamientos en los *loci* del TCR $\gamma$  (Ye *et al.*, 1999) y de la cadena pesada de las Igs (Bertolino *et al.*, 2005), en células T y B respectivamente. En relación a la función del IL-7R en células T y B, varios estudios apoyan la existencia de vías de señalización específicas de linaje tras la activación del IL-7R. Los timocitos humanos CD34<sup>+</sup> activan las vías de STAT5, PI3K y ERK1/2 en respuesta a IL-7, de forma dependiente de la quinasa JAK3, mientras que en los linfocitos B CD19<sup>+</sup> la estimulación con IL-7 activa STAT5 y ERK1/2, pero no la vía PI3K/AKT (Johnson *et al.*, 2008). Esta inducción diferencial de la vía de PI3K podría explicar parcialmente los requerimientos diferenciales de IL-7 durante el desarrollo T y B en humanos.

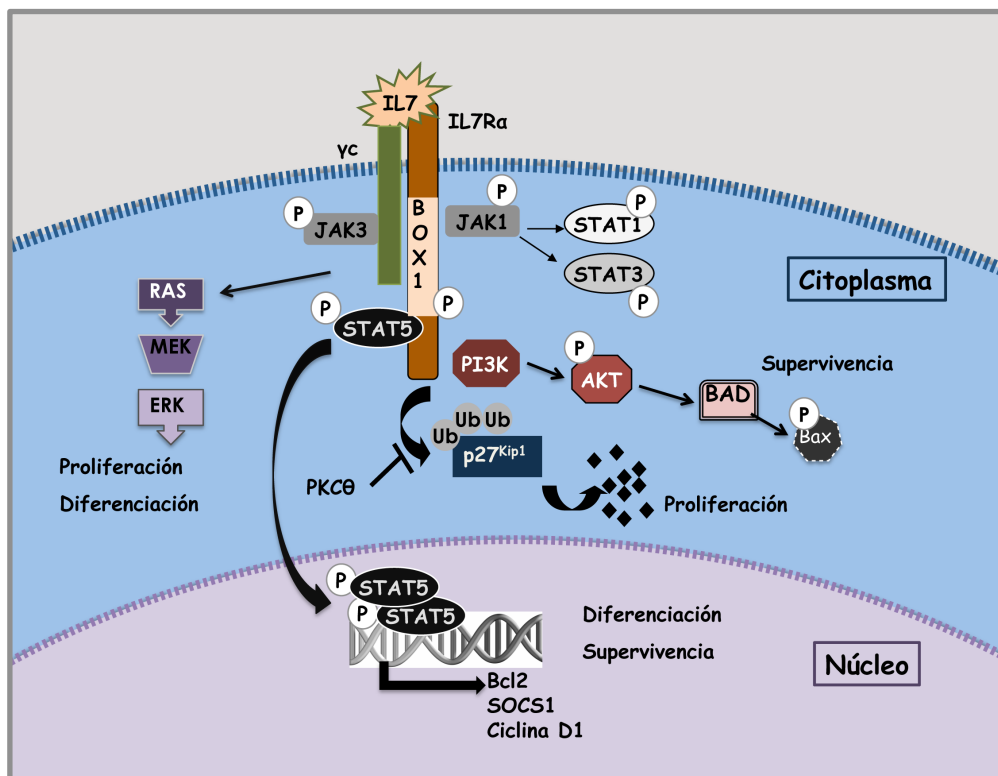


Figura 6. Esquema de la vía de señalización del receptor de IL-7.

### 3.3. Polimorfismos de la cadena IL-7R $\alpha$ .

Dado su importante papel en la homeostasis de las células T periféricas (Schluns *et al.*, 2000), alteraciones tanto en la expresión como en la función de la vía IL-7/IL-7R $\alpha$  se han asociado a diversas enfermedades. La cadena IL-7R $\alpha$  es altamente polimórfica y estudios genéticos poblacionales han demostrado una alta correlación entre ciertos polimorfismos de un único nucleótido o SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) de IL-7R $\alpha$  con el desarrollo de patologías como la esclerosis múltiple (Gregory *et al.*, 2007; Stankovic *et al.*, 2010; Zuvich *et al.*, 2010), diabetes tipo I (Todd *et al.*, 2007) y artropatías inflamatorias crónicas (O'Doherty *et al.*, 2009). Así, el SNP rs6897932, que produce un cambio de aminoácido treonina por isoleucina en posición 244 de la proteína, se ha asociado con una alta susceptibilidad al desarrollo de esclerosis múltiple (Gregory *et al.*, 2007), desorden neurodegenerativo que provoca la desmielinización de las fibras nerviosas. Este polimorfismo está situado en el exón 6, dentro de un sitio de *splicing* alternativo, afectando al balance entre la isoforma de IL-7R $\alpha$  anclada a membrana, que contiene el exón 6, y la isoforma soluble, que carece del dominio transmembrana (Gregory *et al.*, 2007). Se cree que un desequilibrio en este balance afectaría a la señalización del IL-7R, generando una respuesta comprometida de células B y T frente a la infección y favoreciendo la iniciación de la esclerosis múltiple, ya que ciertos estudios apuntan hacia infecciones bacterianas o virales como desencadenantes de esta enfermedad (Correale *et al.*, 2006). Otra posibilidad es que alteraciones en la señal del IL-7R puedan aumentar la respuesta antigénica de los linfocitos T frente a la proteína básica de mielina y la glicoproteína de mielina de los oligodendrocitos. Otros SNPs de IL-7R $\alpha$ , como rs10213865 o rs1494555, se han asociado con la susceptibilidad al desarrollo de sarcoidosis (Heron *et al.*, 2009) o cáncer gástrico (Mahajan *et al.*, 2008), respectivamente. No obstante, son escasos los estudios de genética poblacional centrados en el papel de estos polimorfismos en la susceptibilidad a desarrollar patologías del sistema inmune, como pueden ser inmunodeficiencias primarias o leucemias linfoblásticas. Solamente un estudio ha demostrado una baja asociación del SNP rs1494555 con la susceptibilidad al desarrollo de linfoma folicular (Cerhan *et al.*, 2007). Por tanto, la influencia de los SNPs de IL-7R $\alpha$  en este tipo de patologías permanece aún sin esclarecer.

## 4. Leucemias T linfoblásticas agudas.

### 4.1. La función oncogénica de Notch1.

La leucemia linfoblástica aguda T o T-ALL (del inglés, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*) es un desorden linfoproliferativo que contabiliza entre el 10 y 15% de los casos pediátricos y el 25% de los casos adultos de leucemias linfoblásticas agudas (Pui *et al.*, 2004). Los pacientes muestran un alto riesgo de afectación del sistema nervioso central y un tasa de supervivencia libre de recaída en aproximadamente el 60% de los casos. Se origina debido a la transformación maligna de las células T durante su desarrollo en el timo (Aifantis *et al.*, 2008; Soulier *et al.*, 2005). La expresión de diferentes oncogenes se ha ligado al bloqueo de la diferenciación en estadios particulares del desarrollo T en este tipo de leucemias. Aproximadamente, el 50% de los casos de T-ALLs muestran un cariotipo anormal, con la presencia de translocaciones que implican la yuxtaposición de promotores o *enhancers* de los genes del TCR con factores de transcripción como TAL1, LYL1, LMO1 y LMO2, HOX11 y HOX11L2, debidas, probablemente, a recombinaciones ilegítimas del TCR. Otro tipo de translocaciones suponen la fusión de genes codificando para nuevas proteínas quiméricas, como SIL-TAL1 y las fusiones MLL y ABL con diferentes genes. Este tipo de alteraciones conllevan la expresión aberrante de genes, dando lugar a células T que muestran una disregulación en el ciclo celular, proliferación y diferenciación (revisión en O'Neil y Look, 2007). Recientemente, se ha podido identificar uno de los factores que predisponen a una mayor incidencia (tres veces más) de T-ALLs en hombres que en mujeres (Van Vlierberghe *et al.*, 2010). En este estudio, se han identificado mutaciones inactivadoras del gen *PHF6* en T-ALLs, que afectan tanto a la expresión como a la función de la proteína PHF6, principalmente en pacientes varones, dada su localización en el cromosoma X.

La activación aberrante de Notch1 en T-ALLs fue descrita originalmente en un subtipo poco frecuente (<1%), que presentaba una traslocación cromosómica t(7;9)(q34;q34.3), que generaba una isoforma truncada de Notch1 correspondiente al dominio intracelular activo, denominada entonces TAN-1, y cuya transcripción se hallaba controlada por el *enhacer* altamente activo del TCR $\beta$  (Ellisen *et al.*, 1991). Fueron necesarios más de diez años de intensos estudios para descifrar el papel crítico de Notch1 en este tipo de cáncer, cuando el grupo de J. Aster describió que más del 60% de los pacientes de T-ALLs portan mutaciones activadoras de Notch1 (Weng *et al.*, 2004), lo que demuestra un papel oncogénico de este receptor en la

generación de leucemias más importante de lo sospechado inicialmente. Las mutaciones activadoras de Notch1 en T-ALLs se encuentran localizadas principalmente en el dominio HD y en el dominio PEST. Las mutaciones en HD exponen el sitio S2, facilitando el corte por ADAM y la subsecuente activación de la vía en ausencia de interacción con ligando. Las mutaciones en la región PEST son pequeñas inserciones o deleciones, que resultan en una pérdida parcial o total del dominio, incrementando la estabilidad y vida media de ICN1, debido a un bloqueo en su vía de degradación (Weng *et al.*, 2004). El tratamiento *in vitro* de líneas celulares derivadas de T-ALLs con inhibidores de la vía de Notch1, como GSI (González-García *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2004), dnMAML-1 (Weng *et al.*, 2003), pequeños péptidos sintéticos derivados de MAML-1 (Moellering *et al.*, 2009) o anticuerpos dirigidos frente a la región NRR específica de cada miembro de la familia Notch (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010), han demostrado que la capacidad proliferativa de este tipo de leucemias depende en gran medida de la vía de Notch1, potenciando su estudio como posible diana terapéutica.

La prognosis de las T-ALLs, inicialmente cánceres con una corta esperanza de vida, ha sufrido una gran mejora en los últimos años, debido a intensos tratamientos con quimioterapia. Aun así, los pacientes que presentan recidiva de la enfermedad (15-40% y 40-50% en casos pediátricos y adultos, respectivamente) continúan teniendo un mal pronóstico. Las investigaciones, por tanto, se han centrado en tratar de comprender los mecanismos moleculares activados por Notch1 que puedan ser responsables de la generación y mantenimiento de la enfermedad, con el propósito final de identificar nuevas dianas terapéuticas. Se han descrito varias vías moleculares ligadas a Notch1 durante el desarrollo T que participan en la transformación maligna de estas células. Estudios iniciales mostraron que ratones transplantados con HSCs de médula ósea que expresaban los alelos activos de Notch1 desarrollaban rápidamente leucemias T muy agresivas (Allman *et al.*, 2001; Pear *et al.*, 1996; Pui *et al.*, 1999), pero sólo cuando la señalización a través del pre-TCR se mantenía intacta (Allman *et al.*, 2001). Estos resultados apoyan un papel sinérgico de Notch1 y pre-TCR en la oncogénesis de las células T, similar al descrito para el receptor Notch3 (Bellavia *et al.*, 2002). Si ambas vías actúan de forma lineal o en paralelo aún está por determinar. Apoyando la primera posibilidad, se ha demostrado que *PTCRA* (gen que codifica para la cadena pT $\alpha$ ) es una diana transcripcional de Notch1 (Reizis y Leder, 2002), y la expresión de otros componentes del complejo, como CD3 $\epsilon$  y TCR $\beta$ , está también controlada por Notch (revisión en Aifantis *et al.*, 2008). Otra alternativa es que ambas vías actúen en paralelo, pero que converjan en



una señal común, ya que ambas son capaces de activar los factores de transcripción c-myc, NF- $\kappa$ B y NFAT y las quinasas LCK, IKK y PI3K, y comparten dianas transcripcionales como la ciclina D3 y BCL2-A1 (Aifantis *et al.*, 2008). De acuerdo con esta segunda hipótesis, c-myc, un regulador crucial del metabolismo y del ciclo celular, se ha descrito como diana clave en las leucemias dependientes de Notch1 (Palomero *et al.*, 2006b; Weng *et al.*, 2006). De hecho, la ablación condicional de c-myc en células DP que expresan ICN1 previene la formación de tumores, indicando que ambos son necesarios para el mantenimiento tumoral (Li *et al.*, 2008). Del mismo modo, la señalización por Notch1 conlleva la activación de la vía NF- $\kappa$ B, la cuál parece ser una diana de Notch1 en T-ALLs (Vilimas *et al.*, 2007). Notch1 se ha descrito también recientemente como un regulador negativo de PTEN en T-ALLs (Palomero *et al.*, 2007). La expresión de Hes1 dependiente de Notch1 controla los niveles de PTEN, afectando al balance entre activación e inhibición de PI3K, uno de los mayores inductores de proliferación y supervivencia en células T. Es más, se han identificado mutaciones inactivadoras de PTEN en T-ALLs dependientes de Notch1 (Palomero *et al.*, 2007). En este escenario, la inhibición de Notch1 no sería suficiente para controlar la actividad de PI3K y las células proliferarían de manera independiente de Notch1 por una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT. Así mismo, mutaciones o deleciones en la ligasa de ubiquitinas Fbw7, componente de la vía de degradación de Notch1, que incrementan la estabilidad y vida media de ICN1, se han hallado en diversas líneas celulares y en el 8,6% de los pacientes de T-ALL (O'Neil *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007), indicando la cooperación de ambas vías en el mantenimiento de las células leucémicas.

Aunque las estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir la vía de Notch1, particularmente el tratamiento con GSI, han emergido como una terapia prometedora debido a su habilidad para reducir la viabilidad de las células leucémicas, la aplicación clínica de estas drogas antileucémicas se ha visto restringida, debido al desarrollo de una alta toxicidad gastrointestinal en los pacientes (Deangelo *et al.*, 2006; Milano *et al.*, 2004; Searfoss *et al.*, 2003). Gracias al estudio y conocimiento de los mecanismos moleculares activados por Notch1, el tratamiento combinado de GSI con glucocorticoides como la dexametasona, ya usada previamente para la profilaxis de éste y otros tipos de cáncer, ha permitido bloquear la aparición del daño intestinal (Real *et al.*, 2009), y ofrecen nuevas oportunidades para el uso de inhibidores de Notch1 como terapia en T-ALLs humanas.

#### 4.2. Implicación de la vía del IL-7R en T-ALL.

El importante papel que desempeña el IL-7R en supervivencia y proliferación de linfocitos T y B hace previsible que la señalización a través de este receptor pueda estar implicada en el mantenimiento de las leucemias linfoblásticas. Así, se conoce desde hace tiempo que diversos tipos de células leucémicas expresan receptores de IL-7 funcionales (Dibirdik *et al.*, 1991), y que su señalización favorece la proliferación y el metabolismo de la glucosa a través de la activación de la vía PI3K (Barata *et al.*, 2004). Ratones AKR/J que desarrollan linfomas T de forma espontánea, muestran una sobreexpresión de IL-7R $\alpha$  en sus células T, que favorece su supervivencia *in vitro* y les confiere una ventaja proliferativa en ensayos de trasplantes quiméricos de médula ósea (Laouar *et al.*, 2004). Sin embargo, ratones transgénicos que sobreexpresan IL-7R $\alpha$  bajo el promotor de CD2 humano y, por tanto, la expresión del transgén será específica de células T, muestran una atrofia del timo y una reducción en el número de timocitos totales a medida que los ratones envejecen, debido a una competición entre células DN y DP por la cantidades locales limitantes de IL-7 en el timo (Munitic *et al.*, 2004).

La capacidad de inducción de la proliferación del IL-7R animó a los investigadores a analizar su papel terapéutico en pacientes inmunodeficientes. Sin embargo, pacientes con inmunodeficiencia SCID ligada al cromosoma X trasplantados con células madre de médula ósea que sobreexpresaban la cadena  $\gamma_c$  del IL-7R, desarrollaron leucemias dependientes del oncogen LMO2 (Hacein-Bey-Abina S *et al.*, 2003; 2008; Howe *et al.*, 2008), lo que supuso un bloqueo en el avance de este tipo de terapias. En conclusión, quedan aún sin clarificar los mecanismos moleculares y la implicación de la vía del IL-7R en la generación y mantenimiento de las leucemias T-ALL.

***OBJETIVOS***  
OBJETIVOS



El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido determinar el papel que ejerce la vía de señalización de Notch1 sobre la vía del receptor de IL-7 (IL-7R) en el desarrollo intratímico de las células T humanas y profundizar en el estudio de la implicación de ambas vías en los procesos patológicos que conllevan a la generación de las leucemias T linfoblásticas agudas (T-ALLs).

Los objetivos concretos han sido:

1. Estudio del efecto de la señalización a través de Notch sobre la expresión del IL-7R durante la diferenciación de los linfocitos T humanos en el timo.
2. Análisis de la función de la expresión y señalización a través del receptor de IL-7 en la fisiopatología de las leucemias T-ALL.
3. Estudio de una posible regulación positiva cruzada entre las vías del IL-7R y Notch1 como mecanismo oncogénico en el desarrollo de las células T.



***MATERIALES Y MÉTODOS***





## 1. Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo, su fenotipo y su origen se describen en la **Tabla 1**. Las líneas celulares T y B, y los fibroblastos de riñón humano se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza) y las líneas de fibroblastos embrionarios de ratón se cultivaron en medio DMEM, ambos suplementados con antibióticos (penicilina y estreptomicina), 10mM Hepes (Invitrogen) y 10% de FBS (suero fetal bovino, Gibco, Invitrogen). Las líneas de células estromales OP9 se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos y 20% de FBS.

<i>Nombre</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Referencia</i>
293T	Fibroblastos riñón humano	DuBridge <i>et al.</i> , 1987
ALLSIL	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Minowada <i>et al.</i> , 1988
CUTLL1	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Palomero <i>et al.</i> , 2006a
DND41	T-ALL TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>	Drexler <i>et al.</i> , 1985
HPB-ALL	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Morikawa <i>et al.</i> , 1978
HPB-NUL	Pre-B-ALL	Tsuganezawa <i>et al.</i> , 1998
JURKAT	T-ALL CD4SP	Schneider <i>et al.</i> , 1977
K562	Leucemia mieloide crónica	Lozzio <i>et al.</i> , 1981
KOPTK1	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	Dong <i>et al.</i> , 1995
MEFs RBP-J $\kappa$ +/+	Fibroblastos embrionarios ratón	Timmerman <i>et al.</i> , 2004
MEFs RBP-J $\kappa$ -/-	Fibroblastos embrionarios ratón	Timmerman <i>et al.</i> , 2004
NALM-6	Pre-B-ALL	Hurtwitz <i>et al.</i> , 1979
OP9-GFP	Estroma médula ósea ratón	García-León, MJ (no publicado)
OP9-huDL1	Estroma médula ósea ratón	García-León, MJ (no publicado)
OP9-mDL1	Estroma médula ósea ratón	Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002
P12ICHIKAWA	T-ALL CD4SP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Kitahara <i>et al.</i> , 1978
PHOENIX Ampho	Fibroblastos riñón humano	Kinsella y Nolan, 1996
REH	Pre-B-ALL	Rosenfeld <i>et al.</i> , 1977
RPMI8402	T-ALL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	Huang <i>et al.</i> , 1994
SUPT1	T-LL DP TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	Smith <i>et al.</i> , 1986
U937	Linfoma histiocítico	Sundström y Nilsson, 1976

**Tabla 1. Relación de líneas celulares utilizadas en este estudio.** ALL: leucemia linfoblástica aguda, LL: linfoma linfoblástico.

## 2. Selección de poblaciones celulares.

Las poblaciones de timocitos humanos se aislaron a partir de fragmentos de timo obtenidos en operaciones de cirugía cardíaca correctiva de pacientes de edades comprendidas entre quince días y cinco años. Tras la disgregación mecánica de los fragmentos de timo, las suspensiones celulares se sometieron a centrifugación en un gradiente de densidad (Lymphoprep, Atom). Los timocitos totales obtenidos en la interfase se sometieron a protocolos específicos para el aislamiento de cada una de las siguientes poblaciones:

**2.1 Progenitores de timo humano  $CD34^{++}CD33^{+}CD1a^{-}$  y  $CD34^{+}CD33^{lo}CD1a^{-}$ .** Los timocitos totales se incubaron durante 45 minutos a 4°C con eritrocitos de carnero y posteriormente se sometieron a un gradiente de densidad con objeto de eliminar las células  $CD2^{+}$ . Los progenitores  $CD34^{++}$  y  $CD34^{+}$  se aislaron previa incubación con esferas magnéticas recubiertas de anticuerpo anti- $CD34$  (Dynal) e incubación a 37°C ( $CD34^{++}$ ) o 25°C ( $CD34^{+}$ ). Posteriormente, se eliminaron las células  $CD1a^{+}$  contaminantes tras incubación con esferas anti- $CD1a$  (Miltenyi Biotech) y selección inmunomagnética negativa con AutoMacs (Miltenyi Biotech).

**2.2 Timocitos humanos  $CD4ISP$ , pre- $TCR^{+}$ , DP  $CD3^{-}$ , DP  $TCR\alpha\beta^{+}$ .** Los timocitos totales se sometieron a gradientes de densidad de Percoll (Amershan Biosciences). De la fracción celular de densidad 1.068 g/ml se obtuvieron las poblaciones  $CD4ISP$  y pre- $TCR^{+}$ , se eliminaron las células  $TCR\alpha\beta^{+}$  tras marcaje y posterior selección negativa con anti- $TCR\alpha\beta$ -PE y bolas anti-PE (Miltenyi Biotech); las células pre- $TCR^{+}$  se aislaron por selección positiva y las células  $CD4ISP$  por selección negativa con esferas magnéticas anti- $CD8$  (Miltenyi Biotech). De la fracción celular de densidad 1,08 g/ml se aislaron células DP  $TCR\alpha\beta^{+}$  tras selección positiva con esferas anti- $CD4$  (Miltenyi Biotech) y anti- $CD8$ . Posteriormente, para la obtención de células DP  $CD3^{-}$  se eliminaron células  $CD3^{+}$  mediante esferas magnéticas anti- $CD3$  (Miltenyi Biotech) y selección negativa. Todas las selecciones inmunomagnéticas se realizaron con AutoMacs (Miltenyi Biotech).

**2.3 Timocitos humanos  $CD4SP$  y  $CD8SP$ .** Los timocitos totales se sometieron a selección magnética positiva de  $CD4$  y negativa de  $CD8$  con esferas anti- $CD4$  o anti- $CD8$ , respectivamente, para la obtención de células  $CD4SP$ . Del mismo modo, los timocitos  $CD8SP$  se obtuvieron tras selección positiva con esferas anti- $CD8$  y negativa con esferas anti- $CD4$ , utilizando AutoMacs (Miltenyi Biotech).

**2.4 Progenitores CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical humano.** Se obtuvieron bolsas de sangre de cordón umbilical excedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. La sangre se diluyó 3 veces con PBS1X y se sometió a un gradiente de densidad (Lymphoprep, Atom). Se recuperaron las células mononucleadas de la interfase, se marcaron con esferas magnéticas anti-CD34 (Miltenyi Biotec) y se sometieron a selección magnética manual utilizando columnas LS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec).

### 3. Análisis por citometría de flujo.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de marcadores celulares por citometría de flujo se detallan en las **Tablas 2 y 3**. Para las tinciones de marcadores de membrana, se tiñeron entre  $1-2 \times 10^5$  células con cantidades saturantes de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad, en 50µl de la solución de tinción (PBS, 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica). En el caso de tinciones indirectas con anticuerpos secundarios, se lavaron los anticuerpos primarios con la solución de tinción y se incubaron los anticuerpos secundarios de la misma manera. Para las tinciones intracelulares, previamente se fijaron y permeabilizaron las células utilizando o el tampón CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad, o paraformaldehído 2% durante 30 minutos para fijar y posteriormente metanol 90% para permeabilizar, según el anticuerpo intracelular usado. Para las tinciones de Anexina-V, las incubaciones se realizaron con el tampón de tinción de Anexina (BD Biosciences), según las instrucciones del proveedor. Tras las incubaciones, se lavó el exceso de anticuerpo y se analizaron las muestras en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

Para el análisis del ciclo celular de progenitores intratímicos transducidos con vectores virales que contenían GFP como trazador, se marcaron entre  $1-2 \times 10^5$  células en 200µl de medio de cultivo (RPMI 1640) y se añadió 1µl de la solución DRAQ5 (Biostatus Limited), incubando las muestras en oscuridad 30 minutos. Se realizó un lavado en solución de tinción de citometría y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. Para el caso de las líneas celulares no transducidas, el análisis del ciclo se realizó mediante marcaje con yoduro de propidio. Para ello, se fijaron entre  $1-3 \times 10^6$  de células y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se añadió 1 ml de etanol 70% frío gota a gota, agitando vigorosamente con el *vórtex*. Las muestras en etanol se almacenaron a -20°C al menos durante 24 horas. Previamente al marcaje con yoduro de propidio, las muestras se centrifugaron 5

minutos a 3.000 rpm y 4°C, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 0,5 ml de tampón de ciclo (BD Biosciences). Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y se analizó el marcaje de ADN en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

<i>Especificidad</i>	<i>Conjugado</i>	<i>Clon</i>	<i>Origen/ Isotipo</i>	<i>Fuente</i>
Anexina-V	Biotina	-	-	Roche
BCL2	PE	100	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD1a	PE	SFC119Thy1a8	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD3	PE	UCHT1	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD4	PE-Cy5	13B8.2	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD5	PE-Cy5	BL1a	Ratón IgG2a	Immunotech
CD8	FITC	G42-8	Ratón IgG2a	BD Biosciences
CD8	PE	3B5	Ratón IgG2a	Invitrogen
CD13	PE-Cy5	Immu103.44	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD19	PE	HIB19	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD33	PE-Cy5	D3HL60.251	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD34	FITC	581	Rata IgG2b	BD Biosciences
CD34	PE-Cy5	581	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD38	FITC	HIT2	Ratón IgG1	Lander Diagnostico
CD44	FITC	G44-26	Ratón IgG2b	BD Biosciences
CD45	PE	HI30	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD56	PE-Cy5	N901 (NKH1)	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD127	-	hIL7R-M21	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD127	Biotina	hIL7R-M21	Ratón IgG1	BD Biosciences
CD127	PE	R34.34	Ratón IgG1	Beckman Coulter
CD132	Biotina	TUGh4	Ratón IgG2b	BD Biosciences
CD132	PE	AG184	Ratón IgG1	BD Biosciences
NOTCH1	-	A6	Ratón IgG2b	Abcam
TCR $\alpha\beta$	PE-Cy5	IP26A	Ratón IgG1	Beckman Coulter
TCR $\beta$	-	BF1	Ratón IgG1	ATCC
TCR $\gamma\delta$	PE-Cy5	5A6.E9	Ratón IgG1	Invitrogen
P.STAT5 Y694	Alexa-647	47	Ratón IgG1	BD Biosciences

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo.

<i>Especificidad</i>	<i>Conjugado</i>	<i>Origen</i>	<i>Fuente</i>
IgGs ratón	APC	Cabra	BD Biosciences
IgGs conejo F(ab') <sub>2</sub>	PE	Cabra	Southern Biotech
Estreptavidina	PE	-	Invitrogen
Estreptavidina	APC	-	BioLegend
IgGs ratón	Peroxidasa	Cabra	Jacson IR.
IgGs conejo	Peroxidasa	Cabra	Jacson IR.
IgGs cabra	Peroxidasa	Burro	Santa Cruz

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para citometría de flujo y *Western Blot*.

## 4. Sistemas de diferenciación de progenitores hematopoyéticos humanos.

### 4.1. Cultivos organotípicos fetales híbridos humano/ratón (FTOC).

La diferenciación *in vitro* de progenitores intratímicos humanos hacia células T maduras se analizó mediante la adaptación de un modelo previamente descrito de cultivo organotípico híbrido humano/ratón, basado en la utilización de lóbulos de timo fetal murino como soporte de diferenciación y mimetización del microambiente tímico (Fisher *et al.*, 1990). Este sistema de diferenciación consistía en la extracción de lóbulos tímicos de embriones de 14,5 días de gestación de ratonas Swiss y el cultivo de los mismos con 1,35 mM deoxiguanosina (Sigma) durante 5-7 días, con el fin de eliminar los timocitos murinos y vaciar los nichos intratímicos para que puedan ser colonizados por los progenitores humanos. Seguidamente, los lóbulos se co-cultivaron junto con  $1-2 \times 10^4$  progenitores humanos por lóbulo en gotas colgantes o “*hanging drops*” en placas Terasaki (Nunc). Tras 48 horas, los lóbulos reconstituidos con progenitores humanos se transfirieron a filtros de nitrocelulosa colocados sobre esponjitas empapadas en medio de cultivo IMDM (Lonza) suplementado con 5% FBS y 2% de suero humano (Gibco, Invitrogen), considerándose este paso como día 0 del cultivo. En los experimentos de FTOC en los que se pretendía eliminar la señalización por los receptores Notch, se añadió al medio de cultivo el inhibidor de  $\gamma$ -secretasas Compuesto E (Alexis Biochemicals, Enzo Life Sciences) a una concentración final de 100 nM o dimetil sulfóxido (DMSO, Invitrogen), como control. En los casos indicados, el medio de cultivo se suplementó con 200IU/ml de interleuquina 7 recombinante humana (rhIL-7) (NIBSC).

#### 4.2. Sistemas de diferenciación *in vitro* sobre células estromales de médula ósea OP9 y OP9-DL1.

Se analizó la diferenciación de células madre hematopoyéticas de cordón umbilical humano y de progenitores intratímicos humanos mediante el sistema de diferenciación *in vitro* para células T descrito por Zúñiga-Pflücker y colaboradores (Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002). Básicamente, el sistema se basa en la utilización de una línea celular de estroma de médula ósea de ratón, OP9, modificada genéticamente mediante transducción retroviral para expresar en membrana de forma constitutiva el ligando de los receptores Notch, *Delta-like 1* (DL1). Este sistema permite la generación de células T simples positivas (SP) de ratón y células T DP humanas. En los experimentos de células de cordón CD34<sup>+</sup> humanas transducidas con los diferentes IL-7Rs se utilizó el estroma OP9 modificado para la expresión constitutiva del ligando humano de Notch, Delta-like 1, generado en nuestro laboratorio por M.J. García-León (no publicado). En ambos casos, tanto en los ensayos con el ligando humano como con el de ratón, las células humanas ( $1-2 \times 10^5$ ) se cocultivaron sobre un estroma de OP9 o OP9-DL1 al 70-80% de confluencia en placas de 24 pocillos, en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con antibióticos (penicilina y estreptomicina) y 20% FBS. Para favorecer la diferenciación de células T, se añadieron a los cultivos las citoquinas rhIL-7 (200IU/ml, NIBSC) y Fl3tl recombinante humano (rhFlt3l, 50IU/ml, PreProtech).

#### 4.3. Cultivo *in vitro* de progenitores CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical humano.

Los progenitores de cordón umbilical humano CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> se cultivaron en RPMI1640 (Lonza) con un cóctel de citoquinas que permite la generación de diferentes linajes hematopoyéticos e incluye: rhIL7 (200IU/ml), rhIL-1 $\alpha$  (60IU/ml), rhIL-6 (50IU/ml), SCF murino (50IU/ml), rhGM-CSF (100IU/ml), rhIL-2 (50IU/ml), rhIL-15 (50IU/ml), todas ellas obtenidas del NIBSC.

### 5. Transducciones virales.

#### 5.1. Transducción con vectores retrovirales.

Los vectores retrovirales que codifican para el dominio intracelular de Notch1 humano y GFP (MigR1-ICN1), para el dominio dominante negativo de MAML-1 fusionado a GFP (MigR1-dnMAML1) y el correspondiente vector control que contiene sólo GFP (MigR1-GFP), fueron gratamente cedidos por J.C. Aster (Aster *et al.*, 2000 y

Weng *et al.*, 2003). El ARNm de IL-7R $\alpha$  aislado de timocitos totales humanos o de las diferentes líneas celulares T fue clonado en la diana *EcoRI* del vector MigR1. La producción de sobrenadantes virales se realizó mediante transfección transitoria por electroporación (220V y 1050 $\mu$ F) de la línea empaquetadora Phoenix-*ampho* con los vectores retrovirales anteriormente mencionados. Los sobrenadantes se recogieron en el periodo comprendido entre 48 y 72 horas tras la transfección. Para la transducción de líneas celulares, se plaquearon  $2 \times 10^5$  células en medio RPMI 30% diluido 1/3 con sobrenadante retroviral, en placas de 24 pocillos previamente recubiertas con 8 $\mu$ g/ml de polibreno (Sigma). Tras añadir el sobrenadante retroviral, se centrifugaron las placas a 1.800 rpm a 25°C durante 30 minutos. De este mismo modo, se realizaron 3 rondas de transducción, incubando cada ronda durante 8-16 horas a 37°C.

Para la transducción de progenitores humanos, las células se sometieron a un estimulación previa con citoquinas durante 16 horas. En el caso de los progenitores de timo, las citoquinas usadas fueron SCF de ratón (mSCF, 50IU/ml), rhFl3tl (50IU/ml) e rhIL-7 (200IU/ml). Para las células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical, las citoquinas fueron mSCF (50  $\mu$ l/ml), rhFl3tl (50 IU/ml), rhIL-7 (200 IU/ml) y rhTPO (50ng/ml, Immunotools). Se realizaron 3 rondas de transducción de 8-16 horas en placas de cultivo de 24 pocillos no tratadas (BD Biosciences), con  $1-1,5 \times 10^5$  células por pocillo y previamente recubiertas con 50 $\mu$ g/ml de fibronectina recombinante humana (Retronectin, Takara). El sobrenadante retroviral se diluyó 2/3 con medio RPMI 30% FBS conteniendo las células y 3X la concentración de citoquinas.

## 5.2. Transducción con vectores lentivirales.

Las transducciones lentivirales se realizaron en líneas celulares con el fin de silenciar la expresión de IL-7R $\alpha$  humano. Para la generación de los sobrenadantes, se utilizaron células empaquetadoras 293T. Las células se transfectaron de forma transitoria mediante lipofección (Lipofectamina, Invitrogen) con los siguientes vectores: psPAX2 (gag/pol), pMD2G (envuelta VSV.G) y los vectores lentivirales que contenían las diferentes horquillas de ARN (shRNA) que se utilizaron para el silenciamiento de IL-7R $\alpha$  (shIL7R) o un shRNA “*scrumble*” control (shsc). Se utilizaron dos vectores lentivirales diferentes según el tipo de ensayo, pLKO.1-puro (selección mediante puomicina, Sigma) o pHR SIN, que expresa GFP bajo el promotor de SFFV, en el cuál clonamos el promotor U6 y los diferentes shRNA frente a *IL7R* (Sigma) utilizando las dianas de restricción de las enzimas *NruI* y *EcoRI*. Se recogió un sólo

sobrenadante 48 horas después de la transfección. En el caso de los sobrenadantes de virus portadores de GFP, se calculó el título viral mediante infección de células 293T con cantidades decrecientes de sobrenadante y tras 48-72 horas se analizó por citometría de flujo la proporción de células infectadas (porcentaje de células GFP<sup>+</sup>). Se eligió la cantidad de sobrenadante que infectaba entre el 1 y el 20% de las células y se calculó el título viral como:

Unidades infectivas (IFU/ml, infection units/ml) = Número de células infectadas x Frecuencia de células GFP<sup>+</sup> x Dilución del sobrenadante x Volumen del inóculo.

Una vez conocido el título viral del sobrenadante, se infectaron las líneas celulares con ratios entre número de unidades infectivas y número de células que variaron entre 5-20 (MOI 5-20), en una sola ronda de 24 horas en presencia de polibreno (8µg/ml) y tras centrifugación de 30 minutos a 1.800 rpm a 25°C.

En el caso de transducciones con los vectores lentivirales que contienen la resistencia a puomicina, 72 horas tras la infección se añadió al medio 1µg/ml de puomicina y tras tres días de selección se comenzó el análisis.

## 6. RT-PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa tiempo real.

Para el análisis de la expresión de ARN mensajero mediante RT-PCR, el ARN total se extrajo mediante TRIzol (Invitrogen) y se generó el ADN complementario (ADNc) utilizando oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen) y la enzima retrotranscriptasa inversa Expand RT (Roche). El ADNc se sometió después a amplificación mediante PCR con la enzima Taq polimerasa (Applied Biosystems), en una reacción que contenía 200µM dNTPs (Biotools), 1,5mM MgCl<sub>2</sub> y 0,4µM de los oligonucleótidos (Isogen) correspondientes descritos en la **Tabla 4**. Los niveles de ARNm de actina-β (*ACTB*) se utilizaron como control de amplificación de la reacción de RT-PCR semicuantitativa. Para los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), se generó ADNc mediante el kit de transcripción reversa de Applied Archive (Applied Biosystems) y la reacción de qPCR se realizó con TaqMan MasterMix y las sondas correspondientes (**Tabla 5**), en un equipo ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).



Ensayo	Diana	Secuencia de nucleótidos
RT-PCR	ARNm <i>IL7R</i>	(F) 5'-GCCCTCGTGGAGTAAAGTGC-3' (176) (R) 5'-GGGAGACTGGGCCATACGATAGG-3' (177)
	ARNm <i>ACTB</i>	(F) 5'-GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG-3' (259) (R) 5'-GGTGTAACGCAACTAAGTCATAG-3' (260)
	ARNm <i>IL7</i>	(F) 5'-GGGAATTCATGTTCCATGTTTCTTTTAGG-3' (16) (R) 5'-GGAAGCTTTGCATTTCTCAAATGCCCTAATCCG-3' (17)
	ARNm <i>TSLP</i>	(F) 5'-TGGGACCAAAAGTACCGAGT-3' (719) (R) 5'-TGGGCACCAGATAGCTAAGG-3' (720)
Clonaje <i>IL7R</i> humano	ARNm <i>IL7R</i>	(F) 5'-CGGAATTCCTTATGACAATTCTAGGTACAAC-3' (441) (R) 5'-CGGAATTCTCACTGGTTTTGGTAGAAGCT-3' (442)
Clonaje promotor <i>IL7R</i>	Promotor <i>IL7R</i>	(F) 5'-GGTACCTGTCACTCTTTATTTGGCTT-3' (501) (R) 5'-CTCGAGAGAGAAGCTTAGATCTAGGC-3' (502)
Mutación sitio CSL	Promotor <i>IL7R</i>	(F) 5'-GTCCCAAGGCTTACTGTTACCAAAAAAAGATCTT-3' (525) (R) 5'-AAAGATCTTTTTTTTGGTAACAGTAAGCCTTGGGAC-3' (526)
Inmunoprecipitación de cromatina	Sitio CSL (Promotor <i>IL7R</i> )	(F) 5'-GCTCTGCCATTGTTGCATAA-3' (586) (R) 5'-CACACCACAGTAGGCATTCAA-3' (587)
	Sitio CSL (Promotor <i>HES1</i> )	(F) 5'-CGTGTCTCCTCCTCCATT-3' (588) (R) 5'-GAGAGGTAGACGGG GGATTTC-3' (589)
	Ets site (Promotor <i>IL7R</i> )	(F) 5'-CAGGGAATATCCAGGAGGAA-3' (608) (R) 5'-AGGGAGGGAGGAAGACAGAG-3' (609)
Secuenciación <i>IL7R</i>	ARNm <i>IL7R</i>	Oligonucleótidos 176, 177, 441 y 442 (F) 5'-GCAGAGAAAGCTCCAACCGGCAGC-3' (178)

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos de RT-PCR y para el clonaje del ADNc de IL-7R $\alpha$  humano y de su promotor.** Se indica el tipo de ensayo, el gen diana frente al cuál se diseñó el oligonucleótido y su secuencia. Los números entre paréntesis se refieren al número del oligonucleótido.

<i>Gen Diana</i>	<i>Código sonda</i>	<i>Nº acceso GenBank</i>
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1	NM_000633.2
<i>GABPA</i>	Hs00745591_s1	NM_002040.2
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	NM_002046.3
<i>HES1</i>	Hs00172878_m1	NM_005524.2
<i>IL2RG</i>	Hs00174122_m1	NM_000206.1
<i>IL7R</i>	Hs00233682_m1	NM_002185.2
<i>NOTCH1</i>	Hs00413187_m1	NM_017617.2
<i>PTCRA</i>	Hs00300125_m1	NM_138296.1
<i>SPI-1 (PU.1)</i>	Hs00231368_m1	NM_003120.1

**Tabla 5. Sondas TaqMan (Applied Biosystems) utilizadas para los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real.** Se indica el gen diana, el código de la sonda de Applied Biosystems y el número de acceso del ARNm en GenBank.

## 7. Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western blot*.

La fracción proteica celular total se obtuvo tras lisis en tampón RIPA (1% NP-40, 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS en PBS1X) incluyendo inhibidores de proteasas (1mM PMSF y 1µg/ml leupeptina, aprotinina y pepstatina, Sigma) e inhibidores de fosfatasa (50mM NaF y 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos y se recogieron los sobrenadantes para resolverlos mediante electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida (8-12%) en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*) reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) y se bloquearon con 5% de leche en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) en TBS (TrisHCl 10mM pH 8, NaCl 150mM). La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 6**) se realizó en TBS-0,1%T (Tween20, Sigma) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T 0,1%, tras los cuáles se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidada, indicados en la **Tabla 3**, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, en TBS-T 0,1% más 5% BSA (Roche). Seguidamente se sometieron a una reacción de quimioluminiscencia con Lumi-Light PLUS (Roche). La intensidad de señal se cuantificó por densitometría utilizando el programa TINA.

Especificidad	Origen/ Isotipo	Peso Molecular	Dilución	Fuente
ADAM17	Conejo (P)	135 KDa	1/400	Santa Cruz
Fosfo-AKT S473	Conejo (P)	60 KDa	1/1000	Cell Signaling
AKT	Conejo (P)	60 KDa	1/1000	Cell Signaling
BCL2	Conejo (P)	28 KDa	1/1000	Cell Signaling
C-MYC	Ratón IgG1	62 KDa	1/1000	BD Pharmingen
Fosfo-ERK1/2 T202/Y204	Conejo (P)	42/44 KDa	1/1000	Cell Signaling
ERK1/2	Conejo (P)	42/44 KDa	1/1000	Cell Signaling
ICN1 VAL1744	Conejo (P)	110 KDa	1/1000	Cell Signaling
Fosfo-STAT5 Y694	Conejo (P)	90 KDa	1/1000	Cell Signaling
STAT5	Conejo (P)	90 KDa	1/1000	Cell Signaling
TUBULINA	Ratón	50 KDa	1/2000	Sigma

**Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para ensayos de *Western Blot*.** Se indica la especificidad del anticuerpo, su isotipo y origen animal, el peso molecular de la proteína que reconoce, la dilución usada en el ensayo y la casa comercial.

## 8. Generación de vectores y ensayos de detección de actividad luciferasa.

Un fragmento de aproximadamente 2 kilobases codificante para la región reguladora 5' del gen humano *IL7R* (NM\_002185) comprendido entre el inicio de la transcripción y -1984 pb, se amplificó mediante PCR utilizando la enzima ADN polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene) y se clonó en las dianas *KpnI* y *XhoI* del vector reportero de luciferasa *Firefly* pGL3Basic (Promega). La mutagénesis dirigida del sitio de unión del factor de transcripción CSL en el promotor de *IL7R* se realizó mediante técnicas de PCR convencionales utilizando los oligonucleótidos específicos indicados en la **Tabla 4**.

Para la detección de la actividad luciferasa, se transfectaron transitoriamente células JURKAT por electroporación (264V y 975μF) con el vector reportero de luciferasa que contenía el promotor de *IL7R* y los vectores MigR1-GFP, MigR1-ICN1 y /o MigR1-dnMAML1, junto con el vector productor de luciferasa de *Renilla reniformis* prL-CMV (Promega) como control de transfección. Las células 293T y los fibroblastos embrionarios de ratón RBP-Jκ<sup>+/-</sup> o RBP-Jκ<sup>-/-</sup> se transfectaron mediante fosfato cálcico

o lipofección (Lipofectamina, Invitrogen), respectivamente, con el vector reportero de luciferasa *IL7R* y los vectores MigR1-GFP o MigR1-ICN1, junto con el vector prL-CMV. La detección de la actividad luciferasa *Firefly* y *Renilla* se determinó por triplicado con el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) en un luminómetro Berthold Sirius, y se expresó como inducción relativa con respecto a la transfección con los plásmidos control (pGL3Basic y MigR1-GFP).

## 9. Inmunoprecipitación de cromatina (IPCr).

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, se fijaron las células con 1% paraformaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo glicina a una concentración final de 0,125M, se lavaron las células con PBS1X y se lisaron con tampón de lisis (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris HCl más un cóctel de inhibidores de proteasas [Roche]). Se fragmentó el ADN genómico de los lisados celulares mediante sonicación utilizando un baño de ultrasonidos (Bioruptor, Diagenode) durante 20 minutos a máxima potencia, en ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF, y posteriormente se diluyeron 10 veces en tampón de dilución (0,01% SDS, 1,1 % Tritón X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris HCl, 167mM NaCl e inhibidores de proteasas). Para la inmunoprecipitación de complejos ADN-proteína se utilizaron los anticuerpos frente a Notch1 o PU.1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) o anticuerpos de cabra o conejo, respectivamente, como controles. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con proteína A- agarosa (Sigma) durante toda la noche en rotación. Al día siguiente, los complejos ADN-proteína se lavaron consecutivamente durante 5 minutos en los siguientes tampones: *Low Salt Wash Buffer* (0.1%SDS, 1% Tritón X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl); *High Salt Wash Buffer* (0.1%SDS, 1% Tritón X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl); *LiCl Wash Buffer* (0,26M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,1) y 1X TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0) y se eluyeron con 0,1M NaHCO<sub>3</sub> y 1% SDS. Las uniones ADN-proteína de los eluidos se revirtieron mediante tratamiento con 5M NaCl a 65°C durante 4 horas. El ADN inmunoprecipitado se incubó con 20mg/ml de proteinasa K (Novagen) durante 1 hora a 45°C y posteriormente, se extrajo usando el método de fenol/cloroformo. La cromatina no inmunoprecipitada se usó como control de amplificación, y junto con las muestras de ADN inmunoprecipitadas, se analizaron mediante PCR semicuantitativa utilizando la polimerasa *Immolase* (Bioline) con los oligonucleótidos correspondientes al sitio de

unión de CSL en los promotores de *HES1* o *IL7R* o al sitio de unión de PU.1 en el promotor de *IL7R*, cuya secuencia se muestra en la **Tabla 4**.

## 10. Inhibición farmacológica de las vías de señalización activadas por el receptor de interleuquina-7.

Con objeto de analizar la contribución específica en proliferación y/o supervivencia de las diferentes vías de señalización intracelular (JAK/STAT, PI3K, ERK) activadas por el receptor de interleuquina-7, se realizaron tratamientos con compuestos farmacológicos inhibidores de la actividad de enzimas clave de cada una de las vías. Para bloquear la vía de JAK/STAT, se utilizó el compuesto AG490 (50 $\mu$ M, Calbiochem, Merck); para la vía de PI3K, se utilizó Wortmanina (5mM, Sigma) y para la vía de MEK1-ERK1/2 se utilizó PD98059 (50 $\mu$ M, Calbiochem, Merck).

## 12. Secuenciación de transcritos de ARNm de IL-7R $\alpha$ humano.

La secuenciación de IL-7R $\alpha$  humano en líneas celulares T-ALL se realizó mediante amplificación del ARNm del gen *IL7R* utilizando los oligonucleótidos 441 y 442 (**Tabla 4**) con la enzima ADN polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene). Los fragmentos amplificados se clonaron en el sitio *EcoRI* del vector retroviral MigR1 y se sometieron a ensayos de secuenciación utilizando los oligonucleótidos 176, 177, 178, 441 y 442, cuya secuencia se muestra en la **Tabla 4**, en el servicio de secuenciación del Parque Científico de Madrid. Los SNPs hallados en la secuenciación se enfrentaron a la base de datos de SNPs del NCBI (dbSNP): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

## 13. Ensayos de actividad proteolítica de las metaloproteasas ADAM.

Para determinar la actividad proteolítica de las metaloproteasas ADAM, se utilizó un péptido fluorogénico específico Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH<sub>2</sub> (R&D Systems), capaz de emitir fluorescencia cuando es procesado por ADAM. Brevemente, 1 x 10<sup>6</sup> células se resuspendieron en 1ml de tampón *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS; 0,137M NaCl, 5,4mM KCl, 0,25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3mM CaCl<sub>2</sub>,

1mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>), se añadió el péptido fluorogénico a una concentración final de 6μM y se incubaron las células a 37°C en presencia de los estímulos: 50ng/ml PMA (Sigma), 200IU/ml rhIL-7 y/o el inhibidor de MEK1, PD98059 50μM (Calbiochem, Merck) durante los tiempos indicados. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1.500 rpm, se recogió el sobrenadante y se analizó la fluorescencia, excitando a una longitud de onda de 320nm y midiendo la fluorescencia emitida a 405nm, en un fluorímetro o espectrofotómetro de fluorescencia.

#### 14. Modelo de xenotrasplante en ratones inmunodeficientes.

Para el modelo de xenotrasplante de T-ALLs, se utilizaron ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup>, de edades comprendidas entre las 6 y 8 semanas. Se utilizaron las líneas tumorales HPB-ALL, CUTLL1, JURKAT y NALM6 transducidas con los vectores lentivirales que contienen o el shRNA número 5 frente a IL-7Rα humana (SHIL7R) o un shRNA control o *scramble* (shsc). Para la preparación de las células tumorales previa inyección en los ratones, tres días después de finalizar la ronda de transducción se analizó el porcentaje de GFP<sup>+</sup> por citometría de flujo, con el fin de controlar el porcentaje de infección en el momento de la inoculación. Las células transducidas se lavaron con PBS1X y se resuspendieron en PBS1X a una concentración de 1-4 x 10<sup>7</sup> células/ml y se guardaron en hielo. La inyección se realizó subcutáneamente, de manera que 200μl de la preparación celular (2-8 x 10<sup>6</sup> células) se inyectaron en el flanco derecho de cada uno de los ratones, utilizando jeringas de 0,5ml y agujas de 25G. El desarrollo del tumor se monitorizó cada 2-3 días, hasta que los tumores alcanzaron un volumen máximo de 3,5-4 cm<sup>3</sup>, momento en el que los ratones fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub> y se analizó el contenido celular de los tumores. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula matemática  $a^2 \times b/2$ , siendo *a* y *b* las medidas correspondientes al largo y ancho del tumor. La identificación de las líneas celulares en los ratones se realizó por tinción con anti-CD4 humano para el caso de CUTLL1 y HPB-ALL, anti-CD45 humano para JURKAT y anti-CD19 humano para NALM-6 (Tabla 2).

***RESULTADOS***  
RESULTADOS





## 1. Notch1 regula la expresión del IL-7R y la expansión de los progenitores de los linfocitos T en el desarrollo intratímico.

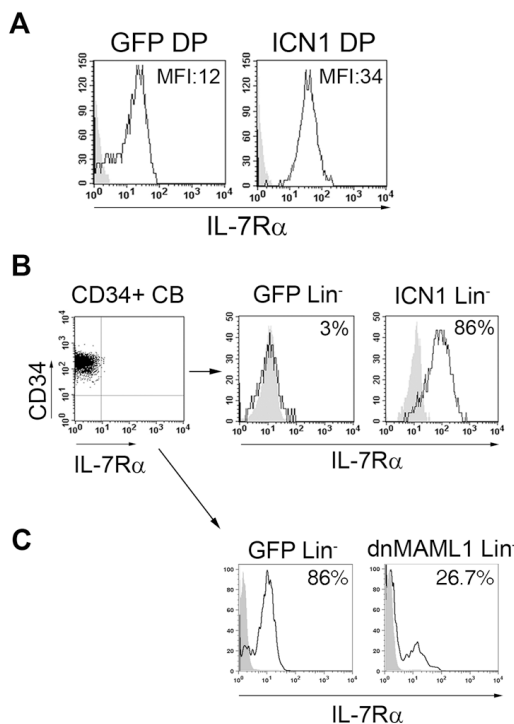
Durante el desarrollo intratímico, tanto en humanos como en ratón, la señalización por la vía de Notch1 es esencial para promover la diferenciación de los progenitores tempranos multipotenciales que colonizan el timo (ETPs) hacia el linaje T. Diferentes estudios, incluidos los de nuestro grupo, han mostrado en los últimos años que la función prevalente de Notch1 durante el desarrollo intratímico es el bloqueo del potencial no-T de los progenitores ETPs, lo que determina la inhibición de la diferenciación mieloide y NK en el timo y permite la generación de células pro-T.

Una vez inducido el proceso de maduración del linaje T, los progenitores pro-T adquieren la expresión del IL-7R, que les confiere la capacidad de responder a la IL-7 producida en el timo, necesaria para su supervivencia y proliferación. El hecho de que ambas vías, Notch1 e IL-7R se activen de forma prácticamente simultánea durante el desarrollo intratímico es un argumento a favor de una función instructiva de Notch1 en la inducción del programa de maduración de los linfocitos T. En este escenario, la idea prevalente es que la expresión del IL-7R es un producto de la progresión hacia el linaje T inducida por Notch1. Sin embargo, existe la posibilidad de que la expresión del IL-7R esté inducida directamente por Notch1. Por tanto, un objetivo de este trabajo ha sido investigar la relación entre la vía de señalización de Notch1 y la expresión y función del IL-7R durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo humano.

### 1.1. La señalización a través de Notch1 induce la expresión de IL-7R $\alpha$ en precursores hematopoyéticos.

Para estudiar la relación funcional entre Notch1 y el IL-7R diseñamos experimentos dirigidos a analizar el impacto de la señalización por Notch1 sobre los niveles de expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-7R (IL-7R $\alpha$ ) en progenitores hematopoyéticos. La detección de IL-7R $\alpha$  en la membrana es indicativa de la expresión de un receptor heterodimérico IL-7R $\alpha$ - $\gamma$ c funcional. En primer lugar, analizamos la implicación de Notch1 en la expresión de IL-7R $\alpha$  durante el proceso de diferenciación de los progenitores intratímicos más tempranos. Para ello, aislamos ETPs de timo humano y los infectamos con vectores retrovirales bicistrónicos que expresaban la porción intracelular de Notch1, que representa la forma

constitutivamente activa de la molécula (ICN1) y GFP, o sólo GFP como control. Los progenitores ETPs transducidos se cultivaron en cultivos organotípicos de timo fetal de ratón (FTOC), en donde analizamos la diferenciación y expresión de IL-7R $\alpha$  en su progenie. Este sistema mostró que los timocitos DP-ICN1<sup>+</sup> presentaban niveles de expresión de IL-7R $\alpha$  más elevados que los timocitos DP-GFP<sup>+</sup> (número de veces de incremento de la media de fluorescencia [MFI] $\pm$ SEM: 2,26 $\pm$ 0,28 de tres experimentos independientes; **Figura 7A**). Así mismo, aislamos HSCs CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical humano (CB; del inglés, *cord blood*) que carecen del IL-7R (**Figura 7B**, izqda.), las transdujimos con ICN1 o GFP y analizamos su progenie en cultivos en suspensión suplementados con multicitoquinas. Observamos que ICN1 inducía *de novo* la expresión de IL-7R $\alpha$  en la progenie de las HSCs (**Figura 7B**, dcha.), caracterizada por la ausencia de marcadores de linaje *Lin*<sup>-</sup>: CD1a<sup>-</sup>, CD2<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD7<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD116<sup>-</sup>, CD122<sup>-</sup> y TCR- $\beta$ <sup>-</sup> (datos no mostrados). Sin embargo, IL-7R $\alpha$  no se expresaba en la progenie *Lin*<sup>-</sup> de las HSCs transducidas sólo con GFP, que representaba sólo un pequeño porcentaje (5%) del cultivo, ya que la mayoría de las células que se generaban en ausencia de ICN1 pertenecían al linaje mieloide (95% de células CD13<sup>+</sup>, datos no mostrados).

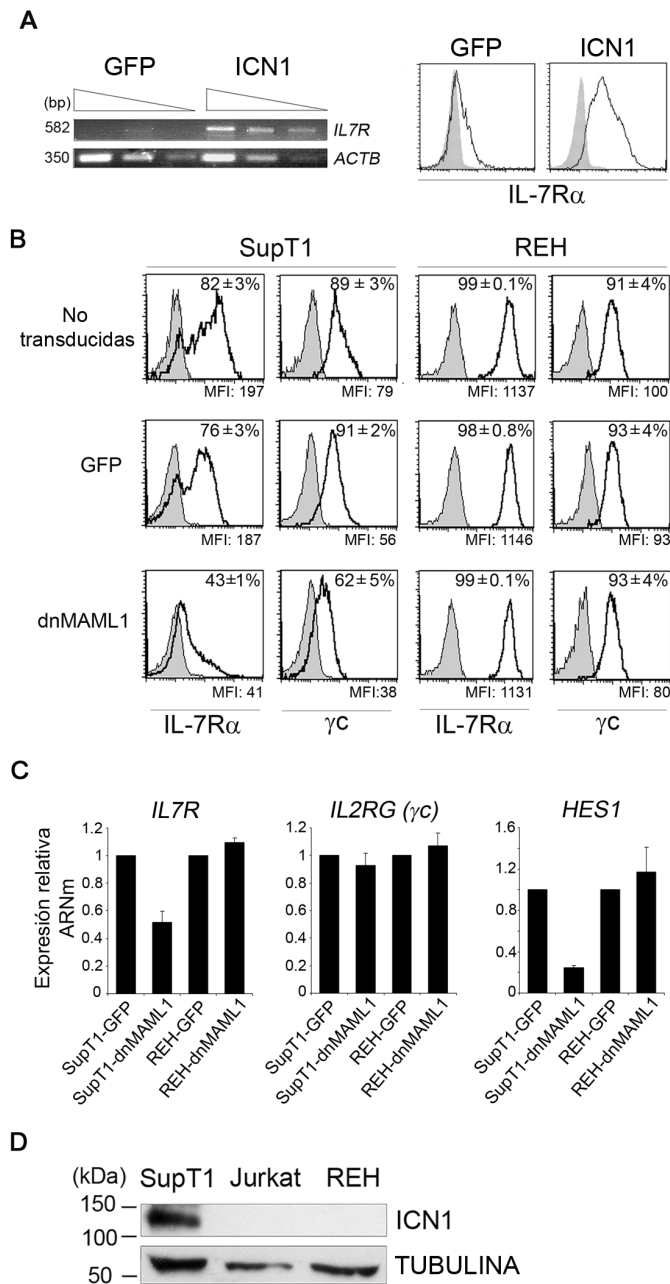


**Figura 7.** La señalización por Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$  en los precursores hematopoyéticos. Expresión de IL-7R $\alpha$  en: (A) timocitos DP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> derivados de ETPs transducidos con ICN1-GFP o sólo GFP, y seleccionados electrónicamente mediante citometría de flujo, tras cultivo en FTOC (día 13); (B) progenitores CD34<sup>+</sup> de CB sin modificar (izqda.) o la progenie *Lin*<sup>-</sup> seleccionada electrónicamente, tras la transducción con ICN1-GFP o sólo GFP y el cultivo en multicitoquinas durante 15 días (dcha.); (C) progenies *Lin*<sup>-</sup> seleccionadas electrónicamente, derivadas de progenitores CD34<sup>+</sup> de CB transducidos con dnMAML-1-GFP o sólo GFP, y cultivados sobre estroma OP9-mDL1 durante 22 días. Los histogramas sombreados muestran la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Los números en los cuadrantes representan la MFI (A) y los porcentajes de células positivas (B y C). Resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Finalmente, quisimos comprobar si una deficiencia en la vía de Notch se traduciría en un defecto en la expresión de IL-7R $\alpha$ . Para ello, se realizaron ensayos de pérdida de función en los que progenitores CD34<sup>+</sup> de CB fueron infectados con un vector retroviral que codifica para una forma dominante negativa del coactivador de Notch1, MAML-1 (dnMAML-1) fusionado a GFP, o sólo para GFP como control. Las células dnMAML1<sup>+</sup> o GFP<sup>+</sup> se cultivaron sobre el estroma OP9-mDL1 que soporta la diferenciación de los linfocitos T y se analizó mediante citometría de flujo la expresión de IL-7R $\alpha$ . Los progenitores GFP<sup>+</sup> control generaron una progenie preferencialmente Lin<sup>-</sup> (90% a día 22 de cultivo, datos no mostrados) que expresaba IL-7R (>85% de las células), como se muestra en la **Figura 7C**. Por el contrario, la progenie Lin<sup>-</sup> equivalente derivada de precursores dnMAML-1<sup>+</sup> (70%) presentaba una expresión significativamente reducida de IL-7R $\alpha$  (<30%). **En conjunto, estos resultados demuestran que la señalización por Notch1 es necesaria para inducir la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en progenitores hematopoyéticos humanos.**

### 1.2. La regulación de la expresión de IL-7R $\alpha$ inducida por Notch1 es específica del linaje celular T.

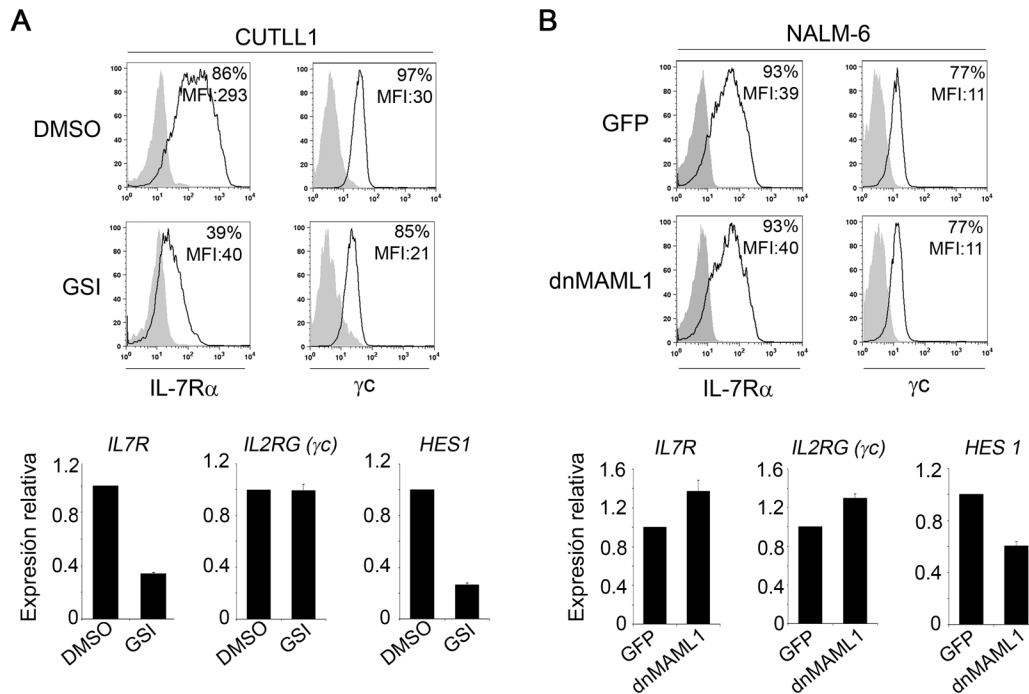
Los resultados anteriores demuestran que la señalización por Notch1 induce la expresión de IL-7R $\alpha$  en los progenitores hematopoyéticos. Para analizar si dicha inducción se debe a una activación directa de la transcripción del gen *IL7R*, utilizamos como modelo clonal la línea celular JURKAT, en donde expresamos de forma ectópica ICN1. Como se muestra en la **Figura 8A** (izqda.) observamos que los niveles de ARN mensajero (ARNm) del *IL7R* se encontraban incrementados en células JURKAT-ICN1<sup>+</sup> en comparación con células JURKAT-GFP<sup>+</sup>. Este incremento se correlacionaba con un aumento de la expresión de IL-7R $\alpha$  en la superficie celular (**Figura 8A**, dcha.), indicando que Notch1 podría estar regulando la expresión del gen *IL7R*. Ya que la inducción de la transcripción del *IL7R* es un evento crítico en la diferenciación de los progenitores linfoides T y B, consideramos de gran importancia investigar si la regulación del *IL7R* por Notch1 es común para ambos linajes o está restringida al linaje T. Para ello, elegimos las líneas celulares SUPT1 y REH, como prototipos de células pre-T y pre-B, respectivamente, y analizamos si los niveles de ARNm del *IL7R* se veían afectados tras la inhibición de Notch, mediante la expresión en ambas líneas de dnMAML-1. Observamos que el bloqueo de la transcripción dependiente de Notch, medido por la disminución en la expresión de su gen diana *HES1*, resultaba en una marcada disminución en la membrana de IL-7R $\alpha$  en las células



**Figura 8.** La inhibición de la señalización por Notch mediante dnMAML-1 impide la transcripción del *IL7R* en células del linaje T. **(A)** Niveles de ARNm del *IL7R* en células JURKAT transducidas con ICN1-GFP o sólo GFP. Se utilizaron diluciones seriadas de ADN complementario que se amplificaron con cebadores específicos y se normalizaron para los niveles de *ACTB* (actina- $\beta$ ) (izqda.). Los niveles de proteína IL-7R $\alpha$  expresados en estas células se analizaron por citometría de flujo (dcha.). **(B)** Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  y  $\gamma$ c en células SUPT1 y REH transducidas con dnMAML1-GFP, sólo GFP, o no transducidas, analizada por citometría de flujo. Los histogramas sombreados representan la tinción con anticuerpos isotópicos irrelevantes. Los números en los cuadrantes representan la media  $\pm$  SEM de los porcentajes de células positivas de tres experimentos independientes. Los valores de MFI del experimento en particular se muestran debajo de cada histograma. **(C)** Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de ARNm de *IL7R*, *HES1* y *IL2RG* en células SUPT1 y REH transducidas con dnMAML1-GFP o sólo GFP. Los resultados se normalizaron frente a los niveles endógenos de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de triplicados. **(D)** Análisis por Western blot de los niveles intracelulares de Notch1 endógeno (ICN1) en células SUPT1, REH y JURKAT. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga de proteína total. Se indica el peso molecular de las proteínas en kilodaltons (KDa).

SUPT1 (Figura 8B), lo cual correlacionaba con la disminución de su ARNm (Figura 8C). Sin embargo, dnMAML-1 no afectaba a la expresión de IL-7R $\alpha$  en células pre-B REH (Figura 8B,C). Los análisis mediante PCR cuantitativa mostraron que la subunidad  $\gamma$ c del IL-7R, codificada por el gen *IL2RG*, permanecía estable en ambas líneas (Figura 8C), confirmando un efecto específico de Notch1 sobre la expresión del *IL7R* en células pre-T SUPT1. Conforme a estos datos, las células SUPT1 expresaban niveles detectables de ICN1 endógeno y no así las células REH (Figura 8D). Estos resultados se corroboraron usando otras líneas celulares T (CUTLL1) y pre-

B (NALM-6) (Figura 9). En conclusión, nuestros resultados indican que la regulación de IL-7R $\alpha$  mediada por Notch1 es específica de células del linaje T.



**Figura 9.** La inactivación de Notch reduce la expresión del *IL7R* selectivamente en el linaje T. Citometría de flujo para la detección de la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  y  $\gamma$ C (arriba) y análisis por PCR cuantitativa del ARNm de *IL7R*, *IL2RG* y *HES1* (abajo) en células del linaje T CUTLL1, tratadas 8 días con 100nM CompE o DMSO como control (A) o del linaje B NALM-6, transducidas con dnMAML1 o GFP y analizadas 6 días después de la transducción (B). Los números en los histogramas representan los porcentajes de células positivas y la intensidad media de la fluorescencia (MFI). Los diagramas de barras muestran la media  $\pm$  SEM de la expresión relativa de triplicados para los genes indicados.

### 1.3. *IL7R* es una diana transcripcional directa de Notch1.

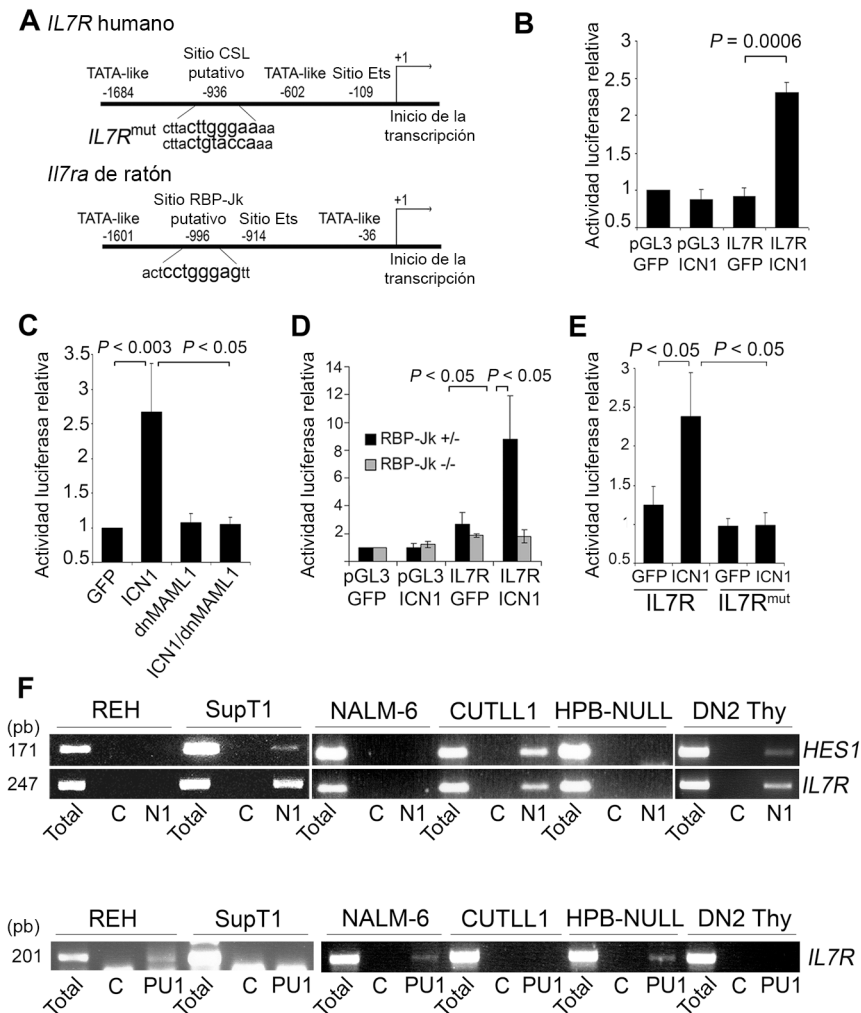
Para examinar si Notch1 activa directamente la expresión del gen *IL7R*, analizamos la inducción del promotor del *IL7R* por Notch1 en ensayos de activación de la transcripción usando vectores de expresión de luciferasa. Para ello, clonamos un fragmento de aproximadamente 2 kilobases de la región 5' del gen *IL7R* humano, que contenía las regiones reguladoras promotoras de la transcripción, en el vector portador de luciferasa pGL3Basic (Promega) (Figura 10A). Utilizando dos líneas celulares distintas, 293T y JURKAT, observamos que este vector, junto con el vector retroviral que codifica para ICN1 y GFP, inducía un incremento significativo de la actividad luciferasa, en comparación con las células transfectadas con el vector retroviral control portador de GFP (Figura 10B, C), lo que sugiere la activación del

promotor del *IL7R* por ICN1. Cuando realizamos el mismo ensayo cotransfectando además con dnMAML-1, observamos que la activación del promotor del *IL7R* se inhibía (**Figura 10C**), lo que demuestra un papel específico de Notch1, a través de su coactivador MAML-1, sobre la transcripción del *IL7R*.

Los receptores Notch son capaces de inducir la transcripción a través de dos mecanismos diferentes, uno dependiente y otro independiente de la unión de ICN1 al factor de transcripción CSL y del subsecuente reclutamiento de un complejo coactivador que incluye p300, CBP y MAML-1 (revisión en Kopan e Ilagan, 2009). El análisis de la secuencia del promotor del *IL7R* permitió la identificación de un sitio putativo (Tun *et al.*, 1994) de unión de CSL localizado en posición -936 bp desde el inicio de la transcripción (**Figura 10A**), lo que apoya la idea de que la inducción de la transcripción del *IL7R* es dependiente de CSL. También identificamos un sitio de unión de CSL homólogo en el promotor del gen *Il7ra* de ratón, en posición -996 pb desde el inicio de la transcripción. Para comprobar si CSL estaba participando en la activación del *IL7R* inducida por Notch1, realizamos los ensayos de luciferasa en fibroblastos embrionarios derivados de ratones homocigotos deficientes para el factor CSL (RBP-J $\kappa$ <sup>-/-</sup>) o de controles heterocigotos (RBP-J $\kappa$ <sup>+/-</sup>) (Timmerman *et al.*, 2004). La expresión de ICN1 indujo la actividad del promotor del *IL7R* en fibroblastos RBP-J $\kappa$ <sup>+/-</sup>, mientras que esta activación se vio seriamente reducida en fibroblastos deficientes RBP-J $\kappa$ <sup>-/-</sup> (**Figura 10D**). Para corroborar la implicación del posible sitio de unión de CSL que habíamos identificado, realizamos también experimentos de mutagénesis dirigida de este sitio en el promotor del *IL7R* (CTTGGGAA a CTGTACCA) y observamos que dicha mutación bloqueaba la inducción del promotor del *IL7R* mediada por ICN1 en los ensayos de luciferasa (**Figura 10E**). **Por lo tanto, la activación de la transcripción del *IL7R* inducida por ICN1 es dependiente de la presencia del factor de transcripción CSL y del coactivador MAML-1.**

Finalmente, analizamos si ICN1 se asocia al motivo de unión de CSL en el promotor del *IL7R* también *in vivo*. Para ello, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (IPCr) con anticuerpos anti-Notch1 utilizando las líneas celulares T SUPT1 y CUTLL1, así como timocitos primarios humanos en el estadio DN2. Estos ensayos confirmaron un enriquecimiento en los inmunoprecipitados de fragmentos de ADN que contienen el sitio de unión de CSL en el promotor del *IL7R*. Sin embargo, este enriquecimiento no se detectó en líneas celulares de origen pre-B como NALM-6, REH y HPB-NUL (Figura 10F, arriba), en las que la ruta de Notch1 está inactiva. Confirmando la especificidad celular de la inmunoprecipitación con anti-Notch1 observamos un enriquecimiento selectivo del

promotor del gen diana de Notch1 *HES1* en los inmunoprecipitados de células T pero no en los de células B. Estos resultados indican que ICN1 se une *in vivo* a CSL en los promotores de *IL7R* y *HES1* en células del linaje T. Sin embargo, este mecanismo no



**Figura 10. Notch regula la transcripción del *IL7R* a través del complejo CSL/MAML-1.** (A) Esquema de la región reguladora 5' del promotor del *IL7R* humano y de ratón. Se indica el posible sitio de unión de CSL. Los números indican la distancia en pares de bases desde el inicio de la transcripción. Ensayos de expresión de luciferasa en (B) células 293T transfectadas con ICN1 o GFP, junto con el vector pGL3 que contiene la región reguladora del *IL7R* mostrada en A (pGL3-IL7R); y (C) células JURKAT transfectadas como en B junto con dnMAML-1 o en su ausencia. Los datos representan la inducción de la actividad luciferasa (número de veces) en relación a células transfectadas con los vectores control pGL3 y GFP vacíos. (D) Actividad luciferasa en MEFs RBP-Jk<sup>+/+</sup> y RBP-Jk<sup>-/-</sup> cotransfectados con el vector pGL3-IL7R junto con ICN1 o GFP. (E) Células 293T transfectadas con ICN1 y el vector pGL3-IL7R con la secuencia intacta del sitio CSL en el promotor del *IL7R* o con el sitio CSL mutado (*IL7R*<sup>mut</sup>) como se muestra en (A). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de triplicados de al menos 4 experimentos independientes. (F) Inmunoprecipitación de cromatina de timocitos humanos DN2, células de linaje T (SUPT1 y CUTLL1) y células pre-B (REH, NALM-6 y HPB-NUL), con anticuerpos anti-Notch1 (N1, arriba) o PU.1 (abajo). Se utilizaron anticuerpos control anti-IgGs de cabra o de conejo. La PCR se realizó sobre ADN total o sobre ADN inmunoprecipitado utilizando cebadores específicos para el sitio CSL en *HES1* y *IL7R* (arriba) o el sitio Ets del *IL7R* (abajo). Los resultados son representativos de uno de tres experimentos independientes.

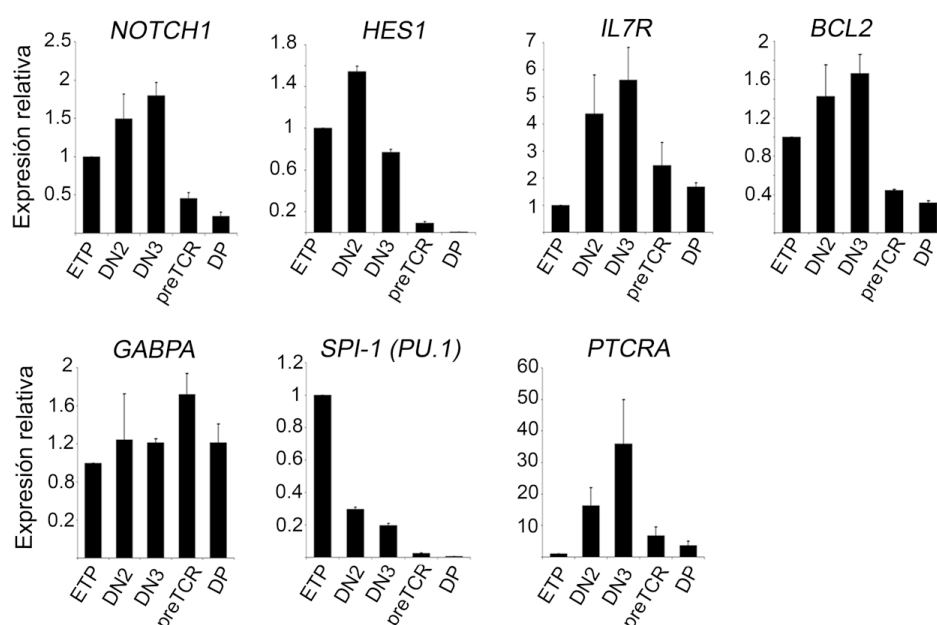


parece ocurrir en células de origen pre-B. En efecto, se sabe que la expresión del *IL7R* en células B inmaduras está regulada por el factor de transcripción PU.1. Conforme a esta idea, nuestros ensayos de IPCr utilizando anticuerpos anti-PU.1 mostraron la unión de PU.1 endógeno al promotor del *IL7R* en todas las líneas pre-B analizadas, pero no en timocitos DN2 ni en las líneas celulares T (Figura 10F, abajo). En resumen, ICN1 interacciona *in vivo* con CSL en el promotor del *IL7R* humano en células pre-T, mientras que PU.1 se asocia al promotor del *IL7R* en células pre-B.

#### 1.4. Notch1 regula la expansión dependiente de IL-7 de los progenitores intratímicos humanos.

El hallazgo de que *IL7R* es una diana transcripcional de Notch1 indica que la activación de Notch1 debe ejercer un papel fundamental en la regulación de la expresión de *IL-7R $\alpha$*  durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo. Para confirmar esta hipótesis, analizamos la expresión de ARNm de *NOTCH1* y de sus genes diana (*HES1*, *PTCRA*), así como del *IL7R* y de su diana *BCL2*, por PCR cuantitativa en timocitos humanos en los diferentes estadios madurativos. Observamos que la activación de Notch, medida a través de los niveles de transcripción de su diana *HES1*, era paralela a la expresión del ARNm del *IL7R* durante el desarrollo de los timocitos humanos; aumentaba en la transición DN1 hacia DN2; alcanzaba niveles máximos en el estadio DN3 y posteriormente declinaba cuando los timocitos alcanzaban el estadio pre-TCR<sup>+</sup> y sufrían la selección  $\beta$  y el paso al estadio DP (Figura 11). La expresión del *IL7R* correlacionaba también con los niveles de ARNm de su diana transcripcional *BCL2* y con los niveles de otra diana de Notch1, *PTCRA*, que codifica para la cadena pT $\alpha$  del pre-TCR. Sin embargo, la expresión de PU.1 (codificado por el gen *SPI-1*) seguía una cinética inversa a la del *IL7R*, ya que su expresión era máxima en ETPs y declinaba progresivamente durante el avance de la diferenciación T. Se había descrito previamente que GABP $\alpha$ , otro miembro de la familia de factores de transcripción Ets, regulaba la transcripción de *Il7ra* en timocitos maduros de ratón (Xue *et al.*, 2004), lo que sugería su posible implicación en la transcripción del *IL7R* en humanos. Sin embargo, al analizar los niveles de ARNm de *GABPA* en timocitos humanos, observamos su expresión constante durante el desarrollo T, sin que existiera correlación alguna con la expresión del *IL7R*. Por tanto, la activación de Notch1 correlaciona con la expresión del *IL7R* durante el desarrollo intratímico humano *in vivo*.



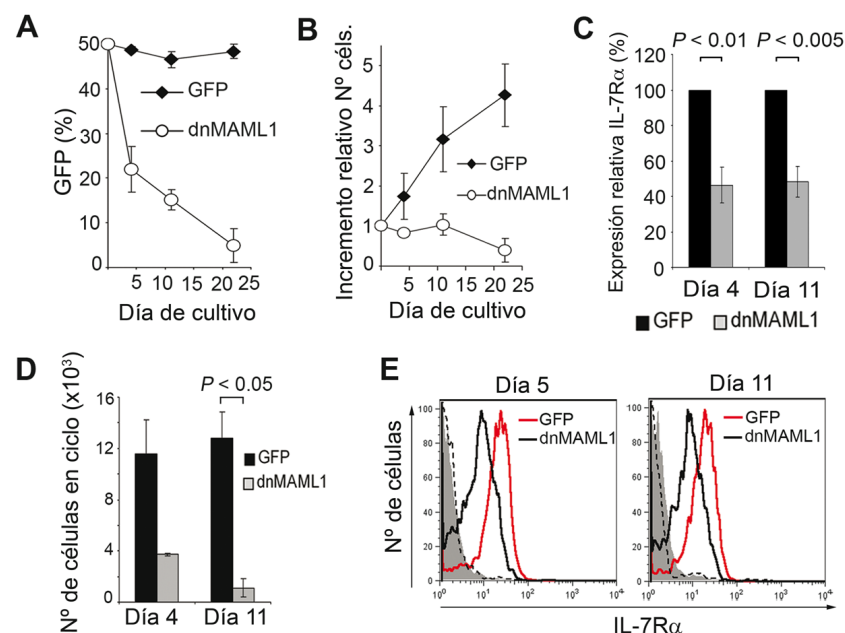


**Figura 11. Regulación de la expresión génica durante el desarrollo temprano de los linfocitos T humanos.** Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los genes indicados. EL ARN total se aisló de timocitos humanos en los estadios: ETP (CD34<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup>), DN2 (CD34<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>), DN3 (CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>), pre-TCR (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> TCRαβ<sup>-</sup>) y DP (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup>). Los datos se normalizaron para la expresión del ARN ribosomal 18S. Las barras representan la media ± SEM de duplicados de al menos dos experimentos independientes.

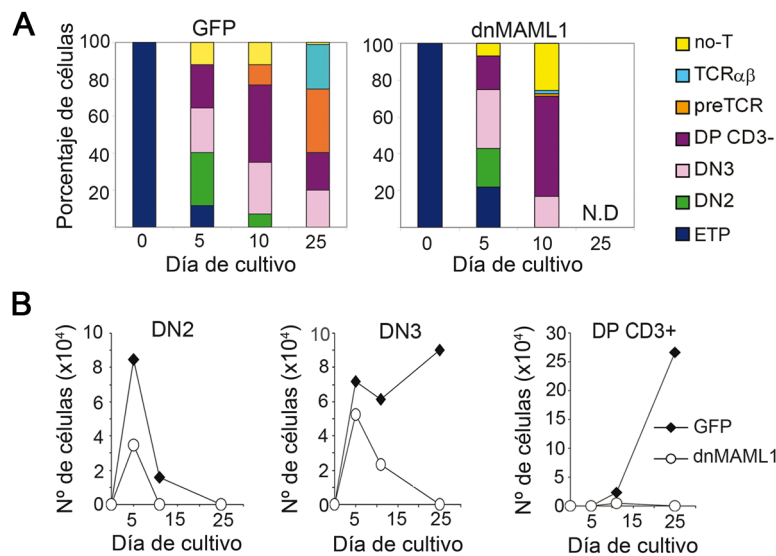
Los resultados obtenidos apoyaban la contribución directa de Notch1 a la regulación de la expresión de IL-7Rα durante la timopoyesis humana *in vivo*. Para confirmar esta posibilidad, analizamos el impacto de la inhibición de la señalización por Notch sobre la expresión del IL-7R en progenitores intratímicos utilizando ensayos de diferenciación T en FTOC. Para ello, sobreexpresamos el inhibidor de Notch, dnMAML-1, fusionado a GFP en ETPs y seguimos su desarrollo *ex vivo* en ensayos de FTOC, utilizando GFP como marcador. Encontramos que la frecuencia de timocitos dnMAML-1<sup>+</sup> decrecía drásticamente durante el cultivo (**Figura 12A**), en comparación con los timocitos ETP control transducidos sólo con GFP. Estos datos sugerían una desventaja proliferativa de las células dnMAML-1<sup>+</sup>, que se confirmó durante las dos primeras semanas de cultivo, y que resultó en una disminución considerable del número de células a las tres semanas (**Figura 12B**). Por el contrario, los números de timocitos control GFP<sup>+</sup> aumentaron de forma constante durante el cultivo. Hay que destacar que el bloqueo de la proliferación de los timocitos inducido por dnMAML-1 correlacionaba con la desaparición de la expresión de IL-7Rα en más del 50% de los timocitos antes de día 12 ( $54,6 \pm 10,1$  y  $51,7 \pm 8,6\%$  a días 4 y 11, respectivamente) (**Figura 12C**) y con un descenso significativo del número de células en ciclo (hasta 14 veces menos a día 11) (**Figura 12D**). Más aún, las células dnMAML-

1<sup>+</sup> que todavía expresaban IL-7R $\alpha$  lo hacían a unos niveles considerablemente menores que las células control GFP<sup>+</sup> (MFI: 12,7 vs. 22,8 y 12,6 vs. 20 a días 5 y 11, respectivamente) (Figura 12E). Estos datos indican que los niveles reducidos del IL-7R expresados en los timocitos dnMAML-1<sup>+</sup> eran suficientes para mantener la supervivencia celular, pero insuficientes para inducir la proliferación en respuesta a la IL-7 de ratón producida localmente en los lóbulos tímicos, que se observaba en las dos primeras semanas en los cultivos control.

Seguidamente quisimos analizar el impacto de la inhibición de Notch sobre el proceso de diferenciación de los ETPs. En términos de diferenciación, la sobreexpresión de dnMAML-1 resultó en el bloqueo completo del proceso de selección  $\beta$ , a juzgar por la inhibición de la generación de timocitos DP CD3<sup>+</sup> (tanto pre-TCR<sup>+</sup> como TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) y el aumento del número de timocitos DP CD3<sup>-</sup> y de células de linaje no-T (Figura 13A). La generación de timocitos con un fenotipo aberrante DP CD3<sup>-</sup>



**Figura 12.** La inhibición de Notch mediante dnMAML-1 disminuye la expresión de IL-7R $\alpha$  y bloquea la expansión de los progenitores DN durante el desarrollo T humano. Progenitores ETPs humanos transducidos con vectores retrovirales dnMAML-1-GFP (dnMAML-1) o sólo GFP (GFP) y cultivados en FTOC. (A) Porcentajes de células transducidas recuperadas a los días indicados y normalizados al 50% de GFP<sup>+</sup> a día 0. (B) Números absolutos de células transducidas representados como incremento relativo con respecto al número de células iniciales (10<sup>4</sup>). (C) Expresión relativa de IL-7R $\alpha$  normalizada al 100% de expresión en células control GFP<sup>+</sup>. (D) Número absoluto de células en las fases S-G2-M del ciclo celular, determinado mediante tinción con DRAQ5 de células seleccionadas electrónicamente GFP<sup>+</sup> o dnMAML-1<sup>+</sup>. Los resultados en A-D representan las medias  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. (E) Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  analizada por citometría de flujo en células GFP<sup>+</sup> y dnMAML-1<sup>+</sup> obtenidas del FTOC a los días indicados. El histograma sombreado representa la tinción con un anticuerpo isotópico irrelevante.



**Figura 13. Notch1 es dispensable para la diferenciación temprana de los progenitores comprometidos al linaje T. (A)** Porcentajes de las poblaciones generadas a partir de ETPs transducidos con GFP o dnMAML-1 y cultivados a los tiempos indicados en FTOC. No-T representa células CD13<sup>+</sup> o CD56<sup>+</sup>. N.D. no determinado, debido a la baja recuperación celular. **(B)** Números totales de timocitos DN2, DN3 y DP CD3<sup>+</sup> generados en A. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

que carecen de la expresión intracelular de la cadena TCR $\beta$  (TCR $\beta$ ic) también se observó en cultivos FTOC suplementados con GSI (**Figura 14**). Podemos concluir, por tanto, que la señalización a través de Notch1 dependiente de CSL y MAML-1 es absolutamente necesaria para inducir el proceso de selección  $\beta$  en el timo humano, al igual que había sido descrito en ratón (Maillard *et al.*, 2006; Wolfer *et al.*, 2002). No obstante, en ausencia de Notch, los progenitores T son capaces de progresar a través de los primeros estadios de diferenciación, previos a la selección  $\beta$ , con eficiencias relativas similares a los controles GFP<sup>+</sup>. De hecho, encontramos proporciones similares de timocitos DN2 y DN3 en los lóbulos reconstituidos con ETPs dnMAML-1<sup>+</sup> o GFP<sup>+</sup>, aunque los números absolutos se encontraban significativamente reducidos en los primeros ( $53 \pm 13\%$  [ $P=0,0164$ ] y  $74 \pm 11\%$  [ $P= 0,002$ ] de timocitos DN3 a días 4 y 11, respectivamente, respecto al control) y las células dnMAML-1<sup>+</sup> desaparecían a día 25 (**Figura 13B**).

De estos resultados se concluye que la señalización a través de Notch1 desempeña un papel crítico en la inducción del IL-7R y en el mantenimiento de la proliferación dependiente de IL-7 en los primeros estadios tras la especificación del linaje T en el timo, pero es dispensable para la diferenciación temprana de estos progenitores. Posteriormente, Notch es necesario para la inducción del proceso de selección  $\beta$ , que también induce una considerable expansión celular, pero independiente de IL-7.

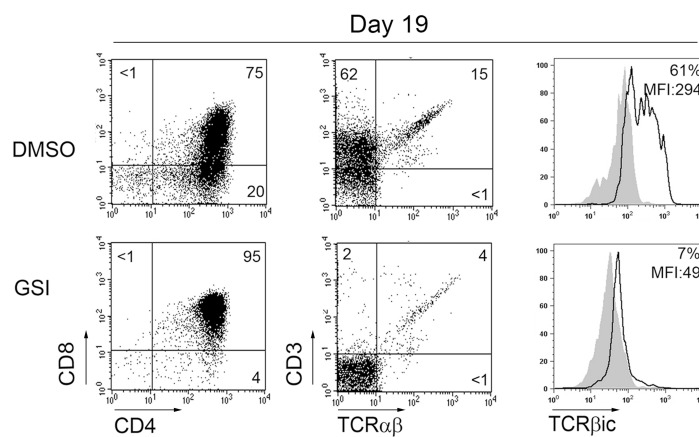
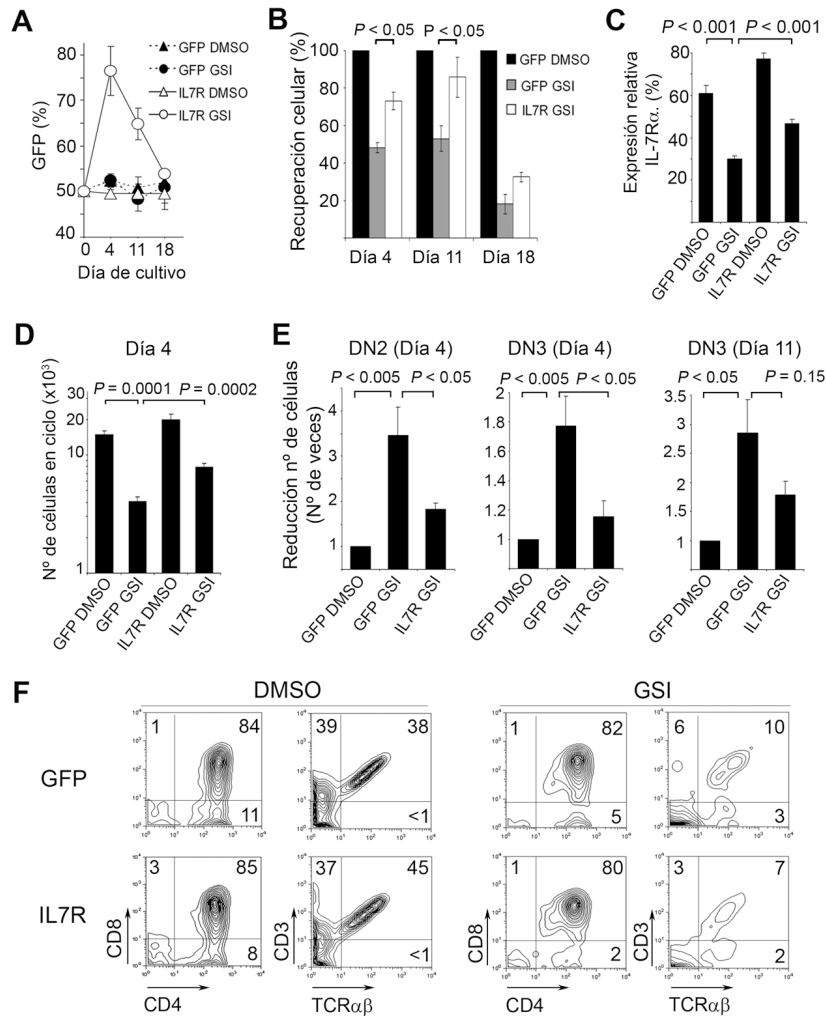


Figura 14. La inhibición de la señalización a través de Notch1 bloquea el proceso de selección  $\beta$  durante la diferenciación intratímica humana. Fenotipo de los timocitos generados a partir de ETPs tratados con DMSO o GSI durante 19 días en FTOC. La expresión intracelular de TCR $\beta$  se determinó en células DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> seleccionadas electrónicamente. Se muestran resultados representativos de uno de 5 experimentos independientes.

### 1.5. La señalización a través del IL-7R es suficiente para mantener la proliferación de los precursores T en ausencia de Notch1.

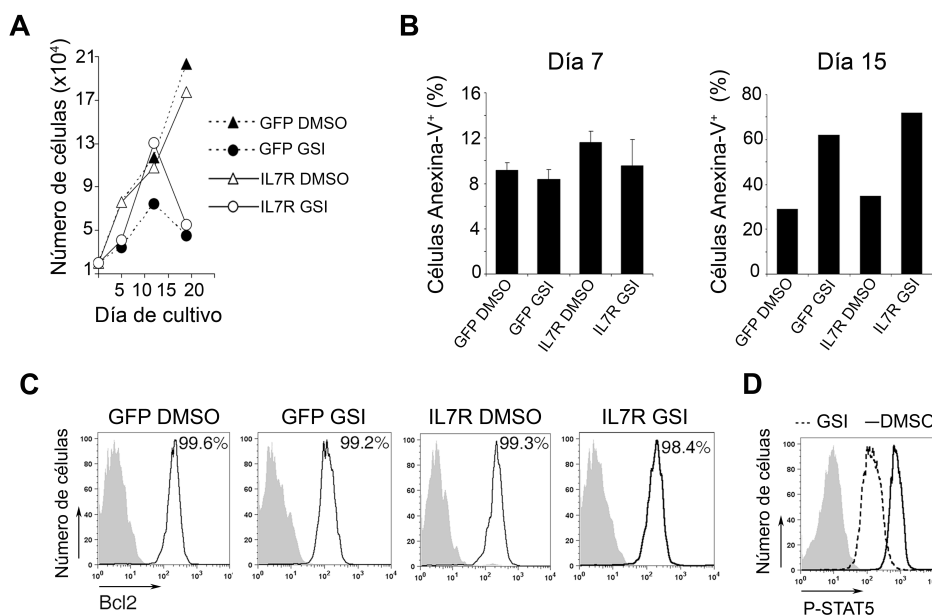
Los datos obtenidos sugieren que, además de la inhibición del potencial no-T, una función prevalente de Notch en los estadios tempranos de la diferenciación T consiste en la inducción de la expansión de los progenitores intratímicos en respuesta a IL-7, mediante la regulación de la expresión de su receptor IL-7R. Para confirmar esta hipótesis, decidimos investigar si la expresión de IL-7R $\alpha$  era suficiente para rescatar el efecto de la ausencia de Notch1 durante la diferenciación T. Para ello, sobreexpresamos por transducción retroviral IL-7R $\alpha$  en progenitores ETP que se cultivaron en FTOC tratados con GSI para bloquear la activación de la vía de Notch o con DMSO como control. Los cultivos se suplementaron con rhIL-7, ya que se sabe que la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$  en timocitos de ratón bloquea la timopoyesis por una competición directa de los timocitos DP con los progenitores DN por la cantidad limitada de IL-7 intratímica (Munitic *et al.*, 2004). En este sistema, la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$  no afectó de forma significativa a la proliferación dependiente de IL-7 de los timocitos con una señalización intacta de Notch, ya que las proporciones de células transducidas con IL-7R $\alpha$  permanecían constantes, en comparación con las células control transducidas sólo con GFP en los cultivos tratados con DMSO (Figura 15A). Por el contrario, las proporciones de células IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> aumentaron de forma significativa en los lóbulos tratados con GSI durante las dos primeras semanas de cultivo (Figura 15A), indicando que la expresión forzada de IL-7R $\alpha$  dotaba a las células que carecen de Notch de una ventaja de crecimiento durante los primeros estadios de su diferenciación. Así, la expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  resultó en un incremento significativo de la recuperación celular durante las dos primeras semanas

de cultivo en presencia de GSI (Figura 15B), que se asociaba con un incremento en las proporciones de timocitos IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> (Figura 15C), con un mayor número de células en ciclo (Figura 15D) y con el rescate en la producción de timocitos DN2 y DN3 (Figura 15E).



**Figura 15.** La expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  rescata la proliferación de timocitos DN con la vía de Notch inactiva, pero no sustituye a Notch durante la selección  $\beta$ . Progenitores ETPs transducidos con vectores retrovirales codificantes para IL-7R $\alpha$  y GFP o sólo GFP, tratados con GSI o DMSO, se cultivaron en FTOC suplementados con rhIL-7. (A) Porcentajes de células GFP<sup>+</sup> recuperados a los días indicados y normalizados a un 50% de células transducidas a día 0. (B) Números relativos de células GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> recuperados de los cultivos tratados con GSI y normalizados al 100% de recuperación células en los cultivos control tratados con DMSO. (C) Porcentajes de células positivas para la expresión de IL-7R $\alpha$  en timocitos derivados de progenitores ETPs GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a día 11 de cultivo en FTOC. (D) Número de células en las fases S-G2-M del ciclo celular determinadas por selección electrónica de células GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a día 4. (E) Producción relativa de timocitos DN2 y DN3 determinada mediante citometría de flujo sobre células GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a los días indicados. Los datos se representan como reducción en los números absolutos normalizados a las células control GFP<sup>+</sup> DMSO. Los resultados en A-E representan medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. (F) Citometría de flujo de CD4 vs. CD8 y TCR $\alpha\beta$  vs. CD3 sobre timocitos transducidos GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a día 19 de FTOC. Los números en los cuadrantes representan porcentajes de células positivas. Datos representativos de uno de tres experimentos independientes.

Sin embargo, la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$  no fue suficiente para rescatar el bloqueo en el proceso de selección  $\beta$  durante la diferenciación de los progenitores ETPs humanos, no observándose la generación de células DP TCR $\alpha\beta$  (Figura 15F). Estos datos sugerían que la expresión del IL-7R es capaz de compensar el efecto de la inhibición de Notch1 únicamente durante las etapas tempranas del desarrollo de los linfocitos T, promoviendo la proliferación y/o la supervivencia celular. En favor de la primera posibilidad, observamos que, previamente al proceso de selección  $\beta$  (hasta día 12-15 de FTOC), el bloqueo de la señalización por Notch1 reducía la proliferación (Figura 16A) pero no afectaba sustancialmente a la supervivencia, como indicaban los niveles de apoptosis medidos por tinción con Anexina-V (Figura 16B, izqda.) o los niveles intracelulares de la proteína anti-apoptótica BCL2 (Figura 16C). En este periodo, por tanto, la expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  fue suficiente para sustituir a Notch1 y mantener la proliferación de las células T inmaduras a unos niveles similares al control (Figura 16A). Posteriormente, sin embargo, la inhibición de la se-



**Figura 16. La expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  rescata la proliferación de timocitos DN en ausencia de Notch pero no la supervivencia celular durante la selección  $\beta$ .** Progenitores ETPs humanos transducidos con IL-7R $\alpha$  y GFP o sólo GFP, se cultivaron en FTOC tratados con DMSO o GSI, y suplementados con rhIL-7. (A) Números totales de células transducidas GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> recuperados a los días indicados, normalizados para 10<sup>4</sup> células iniciales. (B) Números relativos de células apoptóticas determinados por tinción con Anexina-V y 7-AAD mediante citometría de flujo sobre células GFP<sup>+</sup> o IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a día 7 y 15 de FTOC. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de triplicados. (C) Expresión de BCL2 detectada por citometría de flujo, tras tinción intracelular y selección electrónica de células GFP<sup>+</sup> y IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> a día 7 de FTOC. (D) Fosforilación de STAT5 analizada por tinción intracelular y citometría de flujo de progenitores intratímicos cultivados sobre estroma OP9-mDL1 y tratados con DMSO o GSI durante 8 días. Los histogramas sombreados representan la fluorescencia basal con un anticuerpo isotópico irrelevante. Los resultados en A, C y D corresponden a un experimento representativo tres experimentos independientes.

ñalización a través de Notch resultó en la inducción de apoptosis y en la caída drástica de los números absolutos de células (**Figura 16A**), independientemente de la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$ , durante la tercera semana de cultivo (**Figura 16B**, dcha.), coincidiendo con el bloqueo de la selección  $\beta$ . En este punto, las células tratadas con GSI fueron incapaces de responder apropiadamente a la estimulación con IL-7, como indican los niveles reducidos de fosforilación de STAT5 en estas células (**Figura 16D**).

**Colectivamente, nuestros resultados demuestran que, una vez inducida la especificación del linaje T dependiente de Notch1 en los progenitores intratímicos, la expresión del IL-7R promovida por Notch es suficiente para soportar la proliferación y diferenciación de estos progenitores durante los estadios previos, pero no posteriores, al proceso de selección  $\beta$ .**

## 2. Expresión y función del receptor de IL-7 en la fisiopatología de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL).

Las leucemias T linfoblásticas agudas (T-ALL) surgen de la transformación maligna de células T inmaduras durante su desarrollo, por adquisición de mutaciones oncogénicas que proporcionan una capacidad de proliferación descontrolada. Se sabe que más del 60% de las T-ALLs poseen mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1*, por lo que el estudio de los mecanismos por los que la activación aberrante de Notch provoca la aparición de este tipo de cáncer son objeto de estudio en la actualidad en muchos laboratorios.

Los resultados presentados en el apartado anterior indican que Notch1 es un regulador crítico de la expansión dependiente de la vía IL-7/IL-7R de los timocitos humanos. En este contexto hay que destacar que los blastos leucémicos de la mayoría de pacientes con T-ALL expresan IL-7Rs funcionales capaces de inducir proliferación en respuesta a IL-7 (Dibirdik *et al.*, 1991). Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo fue investigar si la señalización por Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$  también en T-ALLs y determinar si la vía IL-7/IL-7R afecta al mantenimiento y expansión de las células leucémicas. Las características fenotípicas y moleculares de las líneas T-ALL utilizadas en este estudio se resumen en la **Tabla 7**.

### 2.1. Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$ en la T-ALL.

Para establecer la contribución de Notch1 a la expresión del IL-7R en las células de la T-ALL, quisimos analizar, en primer lugar, el efecto que producía la inhibición de la señalización por Notch1 en tres líneas celulares de T-ALLs (DND41, HPB-ALL y CUTLL1), que poseen mutaciones activadoras en Notch1 y expresan el IL-7R (**Figura 17A**). Para ello, tratamos las tres líneas T-ALL con GSI, o con DMSO como control y analizamos la expresión de IL-7R $\alpha$  por citometría de flujo durante los 8 días de tratamiento. Como se muestra en la **Figura 17B**, el tratamiento con GSI indujo la disminución gradual (hasta el 70%) de células IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> en las tres líneas T-ALL durante la primera semana de cultivo (**Figura 17B**), lo que corroboraba una función crucial de Notch en el control de la expresión del IL-7R también en células tumorales T-ALL. Los resultados eran en cierto modo previsibles, ya que, como se ha mostrado en la **Figura 8 y 9**, la inactivación de la vía de Notch por GSI resulta en la inhibición de la



transcripción del *IL7R* en varias líneas T-ALL, entre ellas, SUPT1 y CUTLL1. Por tanto, Notch1 regula la expresión del IL-7R $\alpha$  en T-ALLs humanas.

Línea celular	Tipo	NOTCH1	PTEN	JAK/STAT	PI3K/AKT	MAPK/ERK	<i>IL7R</i> ARNm	IL-7R $\alpha$ Proteína
ALL-SIL	T-ALL	HD/P S	WT	-	-	-	+/-	-
CUTLL1	T-ALL	T(7,9) S	WT	-	++	+++	+++	+++
DND41	T-ALL	HD/P S	WT	N.D	++	N.D	+++	+++
HPB-ALL	T-ALL	HD/P S	WT	-	++	+	+++	+++
JURKAT	T-ALL	MUT	MUT	-	+++	+++	+/-	-
KOPTK1	T-ALL	HD/P S	WT	+++	-	++	++	-
P121CHIKAWA	T-ALL	HD R	MUT	-	-	+++	-	-
RPMI8402	T-ALL	HD R	MUT	-	+	+	N.D	-
SUPT1	T-LL	T(7,9) R	N.D	-	++	+	++	++

Tabla 7. Características fenotípicas y moleculares de las líneas celulares de T-ALL utilizadas en este estudio. Se incluyen datos previamente descritos (Weng *et al.*, 2004; Palomero *et al.*, 2006b; 2007) y obtenidos en este trabajo. Se indica el fenotipo (T-ALL, leucemia T linfoblástica aguda; T-LL, linfoma T linfoblástico); el estado mutacional de *NOTCH1* (mutación en dominio de heterodimerización, HD; en el dominio PEST, P; o traslocación cromosómica, t[7,9]), y la sensibilidad, S o resistencia a GSI, R; el estado mutacional de *PTEN* (salvaje, wt; o mutado, mut); la activación constitutiva de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT o MAPK/ERK, indicando la intensidad relativa de la activación según los ensayos de *Western Blot*; la expresión del ARNm del *IL7R* detectado por RT-PCR y la expresión de la proteína IL-7R $\alpha$  analizada por citometría de flujo. N.D. no determinado.

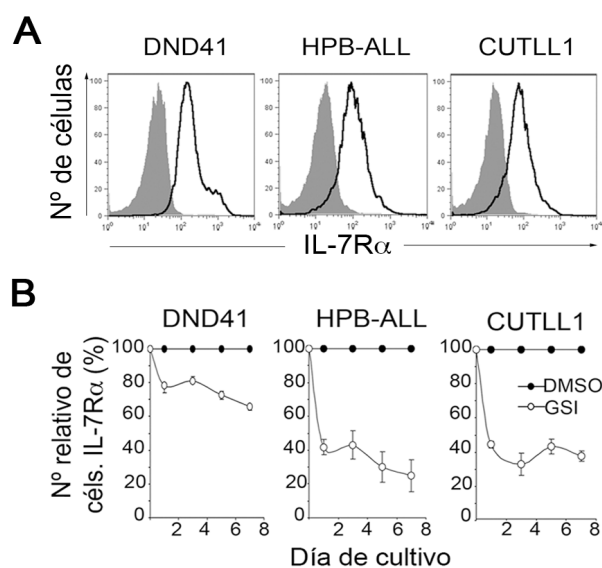


Figura 17. Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$  en T-ALLs. (A) Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  analizada por citometría de flujo en las líneas T-ALL DND41, HPB-ALL y CUTLL1. (B) Porcentajes de células IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> tras el tratamiento de las líneas T-ALL con GSI. Se muestran los valores normalizados al 100% de expresión de IL-7R $\alpha$  en células control tratadas con DMSO.

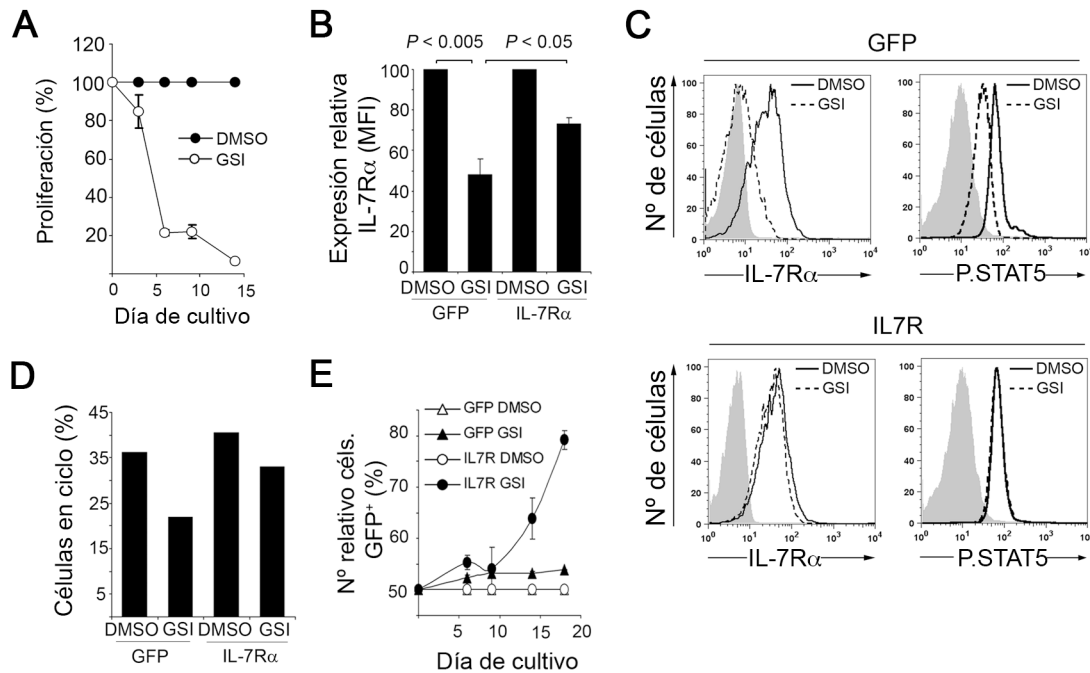
## 2.2. La señalización a través del IL-7R rescata la proliferación de las células T-ALL con Notch inactivo.

Se ha descrito previamente que la inhibición de la activación de Notch1 en T-ALLs por tratamiento con GSI resulta en un bloqueo de la proliferación (Weng *et al.*, 2004 y **Figura 18A**), lo que indica que la expansión oncogénica de las T-ALLs es dependiente de Notch1. Sin embargo, se desconoce la contribución del IL-7R y de la activación inducida a través de este receptor por su ligando, IL-7, al proceso proliferativo de las células leucémicas. Para estudiar esta cuestión, quisimos analizar si la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$  era capaz de rescatar el defecto en proliferación causado por la inhibición de Notch, tal como habíamos observado en condiciones fisiológicas con timocitos primarios. Para ello, transdujimos células CUTLL1 con IL-7R $\alpha$  y las cultivamos en presencia de GSI e IL-7. Como muestran las **Figuras 18B,C**, la transducción con IL-7R $\alpha$  restauró la expresión en la membrana de IL-7R $\alpha$ , la fosforilación de STAT5 (**Figura 18C**), así como la progresión del ciclo celular (**Figura 18D**) en las células tratadas con GSI. Más importante, la expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  proporcionó una ventaja proliferativa en respuesta a IL-7 a las T-ALLs tratadas con GSI, que se tradujo en un incremento significativo de las proporciones de células transducidas sobre las no transducidas o transducidas con GFP (**Figura 18E**).

Por tanto, la señalización a través del IL-7R es capaz de rescatar la proliferación de las células leucémicas de las T-ALL independientemente de la vía de Notch, lo que sugiere que la cooperación entre Notch1 y el IL-7R puede jugar un papel fundamental en la patología de este tipo de leucemias.

## 2.3. Las T-ALLs expresan receptores de IL-7 funcionales.

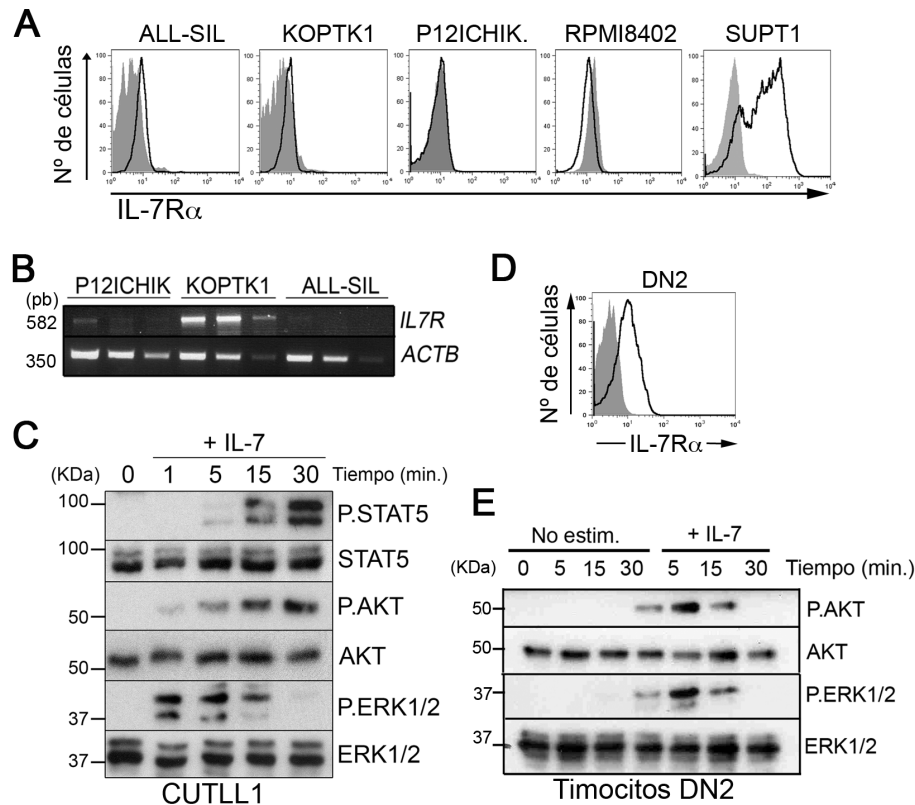
Los resultados obtenidos indican que el IL-7R participa en la supervivencia y proliferación de las T-ALLs dependientes de Notch, lo que sugiere que este receptor de citoquinas podría contribuir a la función oncogénica de Notch1 en las células T. Para investigar esta posibilidad, decidimos analizar cómo influye la expresión y señalización a través del IL-7R en el mantenimiento de las T-ALLs. En primer lugar, analizamos la expresión del IL-7R en un panel de 5 líneas celulares T-ALLs, además de las tres analizadas en la **Figura 17A** que poseen mutaciones activadoras en Notch1. Observamos que el 50% de las líneas analizadas mostraban niveles altos de IL-7R $\alpha$  en la membrana (**Figuras 17A y 19A**), mientras que en otras líneas se detectó expresión de ARNm del *IL7R*, aunque no de proteína en la membrana (**Figura 19B**).



**Figura 18.** La activación de la vía IL-7/IL-7R rescata el defecto en proliferación de las T-ALLs causado por la inhibición de la señalización a través de Notch. **(A)** Proliferación relativa de células CUTLL1 tratadas con DMSO o GSI. Los valores de proliferación se normalizaron para un 100% de proliferación de las células tratadas con DMSO. **(B)** Expresión relativa de IL-7Rα en células CUTLL1 transducidas con IL-7Rα y GFP o sólo GFP, determinada por citometría de flujo tras cultivo con GSI o DMSO durante 10 días. Los valores de MFI están relativizados al 100% de expresión en células CUTLL1 transducidas con GFP y cultivadas con DMSO. **(C)** Niveles relativos de proteína (izqda.) y de activación del IL-7R (dcha.) en células CUTLL1 transducidas y cultivadas como en B, determinados mediante citometría de flujo tras tinción de membrana con anti-IL-7Rα y tinción intracelular con un anticuerpo anti-fosfo-STAT5. El histograma sombreado representa la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. **(D)** Números relativos de células en fases S-G2-M del ciclo celular de un experimento representativo de B, tras selección electrónica sobre células CUTLL1 GFP<sup>+</sup> o IL-7Rα<sup>+</sup> a día 18 de cultivo. **(E)** Porcentaje de células CUTLL1 GFP<sup>+</sup> o IL-7Rα<sup>+</sup> cultivadas como en B y tras normalización al 50% de transducción a día 0. Los datos en A, B y E representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los resultados en C y D representan uno de tres experimentos realizados en diferentes días.

Se ha descrito que la señalización a través del IL-7R activa tres rutas principales de señalización, JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK (revisión en Barata *et al.*, 2005). Sin embargo, el patrón de activación de dichas vías es específico del tipo celular, ya que varía según se trate de células del linaje B o T, células T maduras o inmaduras, o células T humanas o de ratón (Johnson *et al.*, 2008; Pallard *et al.*, 1999). Mediante experimentos de *Western Blot*, confirmamos que los IL-7Rs expresados en las células CUTLL1 eran funcionales y activaban las tres vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK en respuesta a IL-7 (**Figura 19C**). Es importante mencionar que los timocitos primarios DN2 que expresan IL-7Rα *in vivo* (**Figura 19D**), no sólo activaban las vías JAK/STAT y PI3K/AKT como se había descrito previamente (Pallard *et al.*, 1999) sino también la vía MAPK/ERK (**Figura 19E** y datos no mostrados). Por tanto, la señalización a través del IL-7R es funcional en células leucémicas T-ALL y activa

las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK, como ocurre en timocitos primarios DN2.

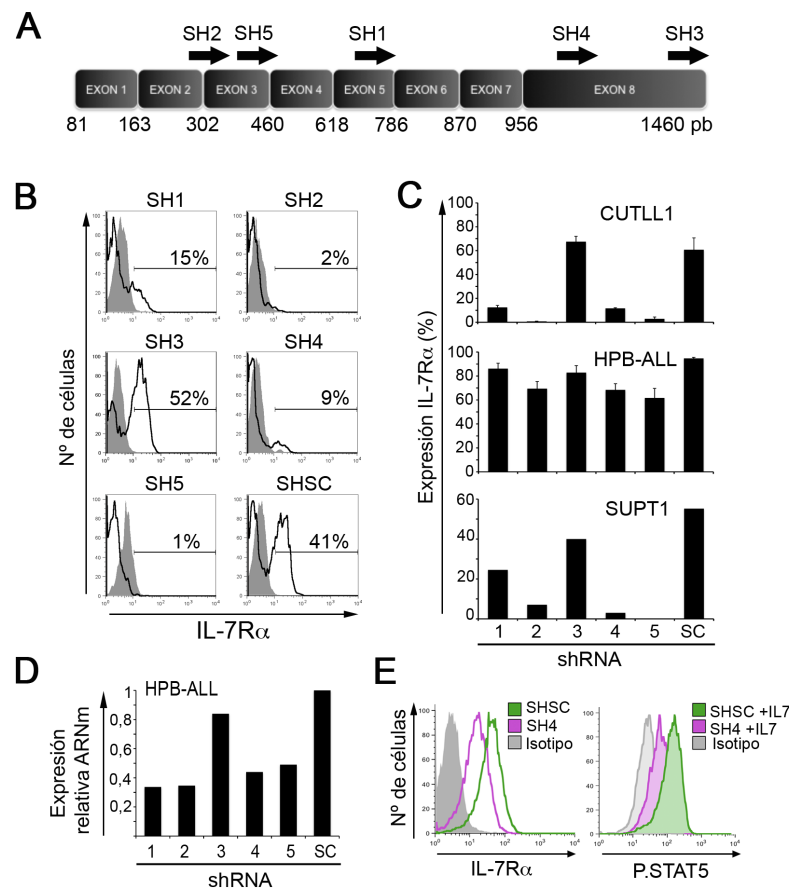


**Figura 19. Las T-ALLs expresan IL-7Rs funcionales.** (A) Expresión de IL-7R $\alpha$  en líneas celulares T-ALLs analizada mediante citometría de flujo. (B) RT-PCR para la detección de ARNm del *IL7R* en líneas T-ALLs en las que no se detecta expresión de la proteína en membrana. (C) Estimulación con IL-7 de células CUTLL1 y detección mediante *Western Blot* de la activación de las vías STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK. (D) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en timocitos humanos DN2. (E) Activación en respuesta a IL-7 de las vías MAPK/ERK y PI3K/AKT en timocitos humanos DN2.

## 2.4. Implicación funcional del IL-7R en la supervivencia y proliferación de las T-ALLs.

La expresión de IL-7Rs funcionales en las T-ALLs sugiere la posibilidad de que estos receptores estén contribuyendo a la proliferación dependiente de Notch de las células leucémicas. Para investigar esta posibilidad, decidimos analizar si la expresión del IL-7R era necesaria para el mantenimiento de la viabilidad y/o la inducción de la proliferación de células T-ALL con la vía de Notch intacta. Con este fin, utilizamos diferentes líneas T-ALLs en las que se silenció de forma estable la expresión de IL-7R $\alpha$  mediante transducción con vectores lentivirales que contenían horquillas o “short hairpins” de ARN (shRNA), capaces de inducir específicamente la

degradación del ARNm del *IL7R*. En concreto, analizamos el efecto de cinco shRNAs (sh1-5) con complementariedad en diferentes zonas del ARNm del *IL7R* humano (Figura 20A) sobre la expresión en la membrana de la proteína IL-7R $\alpha$ , mediante citometría de flujo. Como control, se utilizaron células transducidas con un vector lentiviral portador de un shRNA irrelevante o “scramble” (shsc). Observamos el silenciamiento de IL-7R $\alpha$  a nivel proteico en más del 90% de las células CUTLL1 y SUPT1 con tres de los cinco shRNAs (sh2, sh4 y sh5) (Figura 20B,C).



**Figura 20. Silenciamiento de la expresión de IL-7R $\alpha$  en T-ALLs.** (A) Representación esquemática de los sitios de reconocimiento de los shRNAs (sh1-5) en el ARNm del *IL7R* humano. (B) Expresión de IL-7R $\alpha$  en la membrana de células CUTLL1 infectadas con vectores lentivirales que contienen los diferentes shRNAs frente al *IL7R* y seleccionadas con puromicina durante 4 días. Se muestra el porcentaje de células positivas. (C) Porcentaje de células positivas para la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en las líneas CUTLL1, HPB-ALL y SUPT1 infectadas con los diferentes shRNAs frente al *IL7R*. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. (D) Expresión relativa de ARNm del *IL7R* analizada mediante PCR cuantitativa en células HPB-ALL infectadas con los diferentes shRNAs. Los valores se normalizaron a la expresión endógena de *GAPDH*. (E) Expresión en la membrana de IL-7R $\alpha$  (izqda.) e intracelular de fosfo-STAT5 (dcha.) en células HPB-ALL infectadas con sh4 o shsc y estimuladas con rhIL-7 durante 30 minutos.

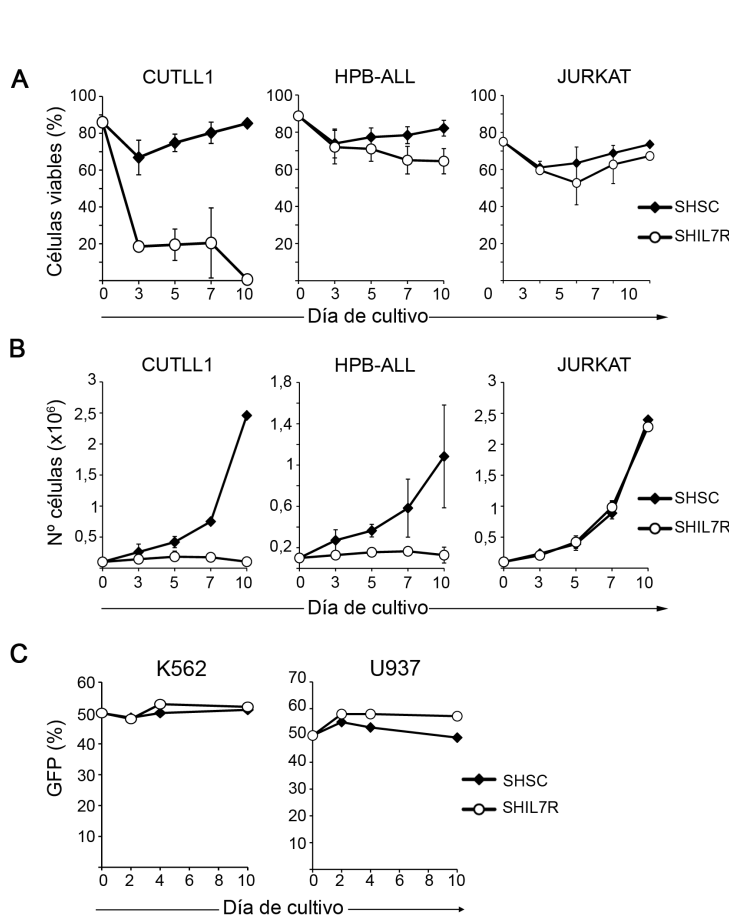
Sin embargo, en la línea HPB-ALL estos mismos shRNAs indujeron un silenciamiento parcial de la expresión del ARNm del *IL7R* (**Figura 20D**), de modo que entre el 70% y el 80% de las células seguían expresando IL-7R $\alpha$  en la membrana (**Figura 20C**), aunque con niveles de expresión significativamente menores que los controles (**Figura 20E**, izqda.). Esta disminución de la expresión de IL-7R $\alpha$  en membrana era funcionalmente significativa, ya que la señalización en respuesta a IL-7 de estas células, cuantificada por la fosforilación de STAT5 mediante citometría de flujo, se vio considerablemente reducida (**Figura 20E**, dcha.).

**En conclusión, la estrategia de silenciamiento resultó en la inhibición total de la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en las líneas T-ALL SUPT1 y CUTLL1 y en la inhibición funcional del IL-7R en la línea HPB-ALL.**

A continuación, quisimos determinar el efecto del silenciamiento de IL-7R $\alpha$  sobre la supervivencia y proliferación de las T-ALLs. Construimos para ello vectores lentivirales portadores del sh5 y GFP o del shsc y GFP como control y analizamos la viabilidad y proliferación *in vitro* de las células infectadas mediante la cuantificación del porcentaje de células totales viables (**Figura 21A**) y de los números absolutos de células GFP<sup>+</sup> (**Figura 21B**) a lo largo del cultivo. Incluimos en el estudio tres líneas celulares: CUTLL1 y HPB-ALL, ambas IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> con distintos niveles de silenciamiento, y la línea IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> JURKAT como control. Los cultivos se establecieron en ausencia de IL-7, ya que la proliferación de las tres líneas es independiente de IL-7. El silenciamiento de IL-7R $\alpha$  redujo drásticamente (hasta un 80%) la viabilidad de las células CUTLL1, a tiempos cortos postinfección (día 3), no recuperándose células viables a día 10 (**Figura 21A**). En las células HPB-ALL, la viabilidad celular se vio afectada en menor medida, recuperándose hasta un 80% de células viables a día 10. Por el contrario, no observamos un efecto significativo del silenciamiento de IL-7R $\alpha$  sobre la viabilidad de las células JURKAT, en comparación con los cultivos control infectados con shsc (**Figura 21A**). A pesar del diferente impacto que el silenciamiento de IL-7R $\alpha$  provocaba sobre la viabilidad de las células CUTLL1 y HPB-ALL, en ambos casos observamos un bloqueo significativo de la expansión celular, sin afectarse la proliferación de las células JURKAT (**Figura 21B**). Igualmente, el silenciamiento del IL-7R $\alpha$  no indujo ningún efecto en la proliferación de otras líneas celulares no linfoides como U937 o K562 (**Figura 21C**).

Estos resultados sugieren que la drástica inhibición de la expresión de IL-7R $\alpha$  en células CUTLL1 bloquea significativamente la viabilidad celular, mientras que el silenciamiento parcial de IL-7R $\alpha$  en células HPB-ALL afecta esencialmente a la

proliferación celular sin alterar sustancialmente la viabilidad. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron experimentos dirigidos a analizar directamente la inducción de apoptosis y el ciclo celular de las células silenciadas, mediante tinción con Anexina-V o yoduro de propidio, respectivamente, y citometría de flujo.



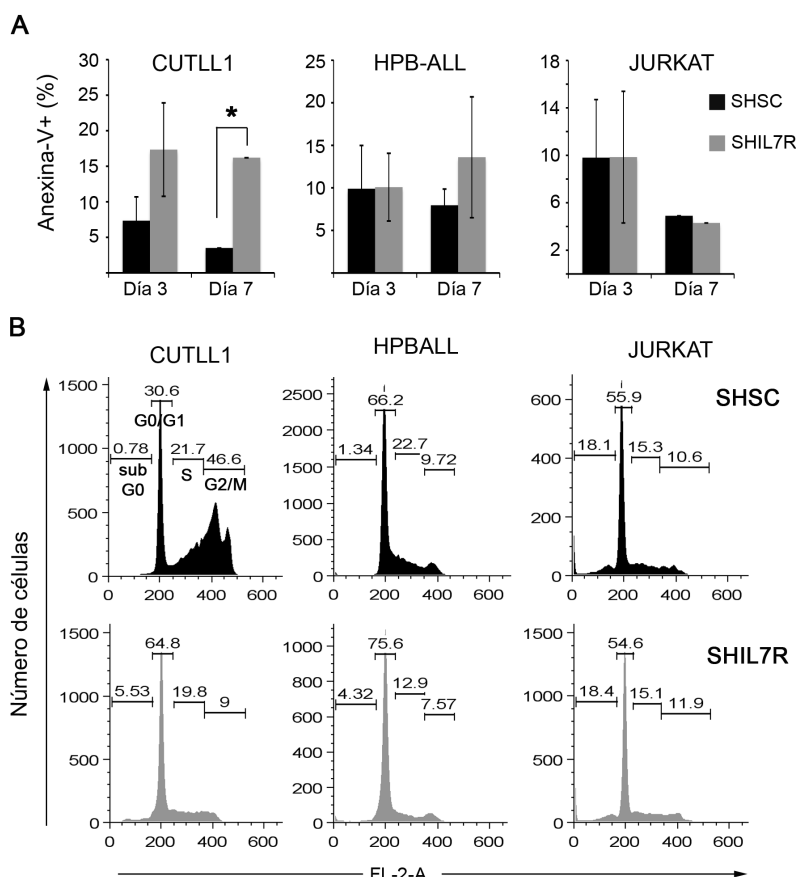
**Figura 21.** El silenciamiento de IL-7R $\alpha$  reduce la proliferación y viabilidad celular de las T-ALLs IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>. (A,B) Transducción lentiviral con shIL7R (sh5) o sh control (shsc) de dos líneas IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> (CUTLL1 y HPB-ALL) y una línea control IL-7R $\alpha$ <sup>-</sup> (JURKAT), y análisis tras su cultivo *in vitro* de: (A) la proporción de células viables, cuantificada por citometría de flujo (FSC vs. SSC); (B) la proliferación celular, medida como número de células recuperadas en el cultivo. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. (C) Transducción de células K562 y U937 con shIL7R o shsc control y análisis del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> durante el cultivo, analizados por citometría de flujo.

Como se muestra en la **Figura 22A**, sólo las células CUTLL1 mostraron un aumento significativo de la apoptosis tras su infección con el shIL7R, mientras que el porcentaje de células Anexina-V<sup>+</sup> tras el silenciamiento de las líneas HPB-ALL y JURKAT no difería significativamente de los controles. El análisis del ciclo celular, mostró que, tanto las células CUTLL1 como las HPB-ALL silenciadas con el shIL7R, sufrían una parada del ciclo celular en las fases G0/G1, con la consecuente reducción de la proporción de células en ciclo (fases S + G2/M) en comparación con sus controles (**Figura 22B**). Por el contrario, el ciclo celular de JURKAT no se vio afectado. Por tanto, el silenciamiento parcial de IL-7R $\alpha$  en HPB-ALL es suficiente para bloquear la proliferación, aunque los niveles disminuidos de expresión del IL-7R parecen ser suficientes para mantener la viabilidad celular. En células CUTLL1, por el



contrario, el silenciamiento parece inducir la pérdida del IL-7R por debajo de los niveles de expresión necesarios para mantener la viabilidad celular.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que la expresión de IL-7R en las T-ALLs desempeña una función crítica en la supervivencia y proliferación leucémica *in vitro*.



**Figura 22.** La inhibición de la expresión de IL-7R $\alpha$  induce la apoptosis y detiene el ciclo celular de las T-ALLs. Transducción con vectores lentivirales shIL7R o shsc de células T-ALL IL-7R $\alpha^+$  (CUTLL1 y HPB-ALL) o IL-7R $\alpha^-$  (JURKAT) y posterior citometría de flujo. (A) Tasa espontánea de apoptosis medida como porcentaje de células Annexin-V $^+$ . Las barras representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes a los días indicados.\* $p < 0.05$ . (B) Análisis del ciclo celular por marcaje con yoduro de propidio a día 7 tras la infección. Los números en los histogramas representan los porcentajes de células en cada fase del ciclo.

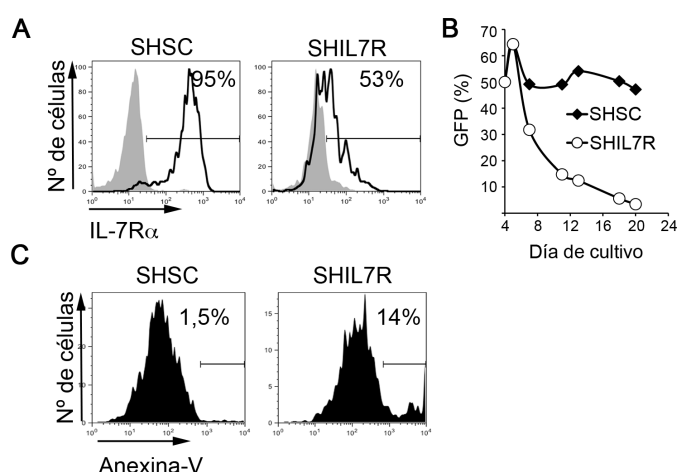
## 2.5. La expresión y función del IL-7R son necesarias para la proliferación de las pre-B-ALLs.

Al igual que ocurre durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo, los linfocitos B son dependientes de la señalización a través del IL-7R durante las primeras etapas de su diferenciación en la médula ósea (Lee *et al.*, 1989). Posteriormente en el desarrollo, la expresión del IL-7R debe regularse negativamente para que la maduración de las células B progrese, de modo que el IL-7R se expresa en células pre-B pero no en células B maduras. En consecuencia, las leucemias pre-B linfoblásticas agudas expresan el IL-7R, lo que les confiere una mayor ventaja proliferativa (Sasson *et al.*, 2010). Considerando la relevancia de la expresión del IL-7R en la supervivencia de las T-ALLs, nos planteamos estudiar la posibilidad de que



esta dependencia del IL-7R existiese también en las pre-B ALLs. Para ello, utilizamos la línea celular pre-B humana NALM-6 que expresa el IL-7R y procedimos al silenciamiento del IL-7R por infección con el shIL7R como hemos descrito para las T-ALLs. La infección redujo significativamente la expresión de IL-7R $\alpha$  en comparación con las células infectadas con el shsc control (**Figura 23A**). Esta reducción de los niveles de expresión del IL-7R provocó un defecto en la proliferación celular que se manifestó en la progresiva disminución del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> infectadas con el shIL7R durante el cultivo (**Figura 23B**). Al analizar el efecto del silenciamiento sobre la supervivencia celular observamos que el shIL7R inducía un incremento en el porcentaje de células apoptóticas (**Figura 23C**). Estos datos se corroboraron en otra línea pre-B ALL (REH, datos no mostrados).

En conclusión, la expresión del IL-7R participa en la supervivencia y proliferación *in vitro* de las leucemias pre-B ALL.

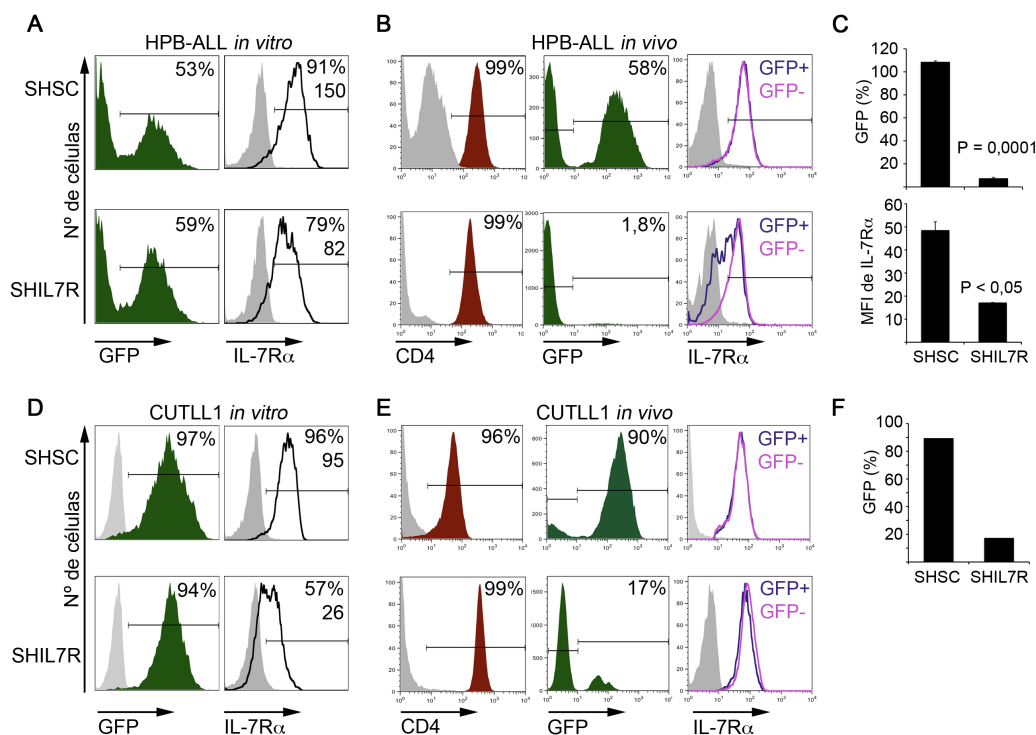


**Figura 23.** Las leucemias pre-B ALL son dependientes de la expresión del IL-7R para su mantenimiento *in vitro*. La línea celular NALM-6 se infectó con un vector lentiviral que expresa shIL7R y GFP, ó shsc y GFP como control. (A) Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células positivas. (B) Porcentaje de células GFP<sup>+</sup> infectadas con shIL7R o shsc durante el cultivo, analizados por citometría de flujo. (C) Porcentaje de células apoptóticas analizadas por tinción con Anexina-V y citometría de flujo 7 días tras la infección. Se indica el porcentaje de células positivas.

## 2.6. El IL-7R contribuye al potencial oncogénico de las leucemias linfoblásticas agudas de origen T y B *in vivo*.

Los resultados obtenidos sugieren que el IL-7R contribuye a la proliferación de las ALLs, T y pre-B, *in vitro*, por lo que era importante analizar la contribución del IL-7R al desarrollo tumoral *in vivo*. Se ha descrito que las T-ALLs inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, o previamente irradiados, son capaces de generar rápidamente tumores sólidos, que posteriormente colonizan los órganos linfoides secundarios y finalmente establecen metástasis en diferentes órganos, entre ellos el sistema nervioso central (Lilleyman y Sudgen, 1981). Por tanto, basamos nuestro estudio en este sistema experimental y realizamos ensayos

de xenotrasplante de líneas T-ALLs en ratones inmunodeficientes Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>. Los ratones se inyectaron subcutáneamente con diferentes líneas ALLs transducidas con el shRNA frente al IL-7R (shIL7R) o con el shRNA control (shsc), utilizando en ambos casos GFP como marcador de células transducidas. Realizamos los experimentos con las dos líneas T-ALL que expresan el IL-7R (CUTLL1 y HPB-ALL), con la línea T-ALL JURKAT que no expresa el IL-7R como control y con una línea pre-B-ALL IL-7R<sup>+</sup> (NALM-6). Se utilizaron poblaciones celulares heterogéneas en las que el porcentaje de células transducidas GFP<sup>+</sup> oscilaba entre el 50 y el 90%, según la línea celular (Figura 24A,D).



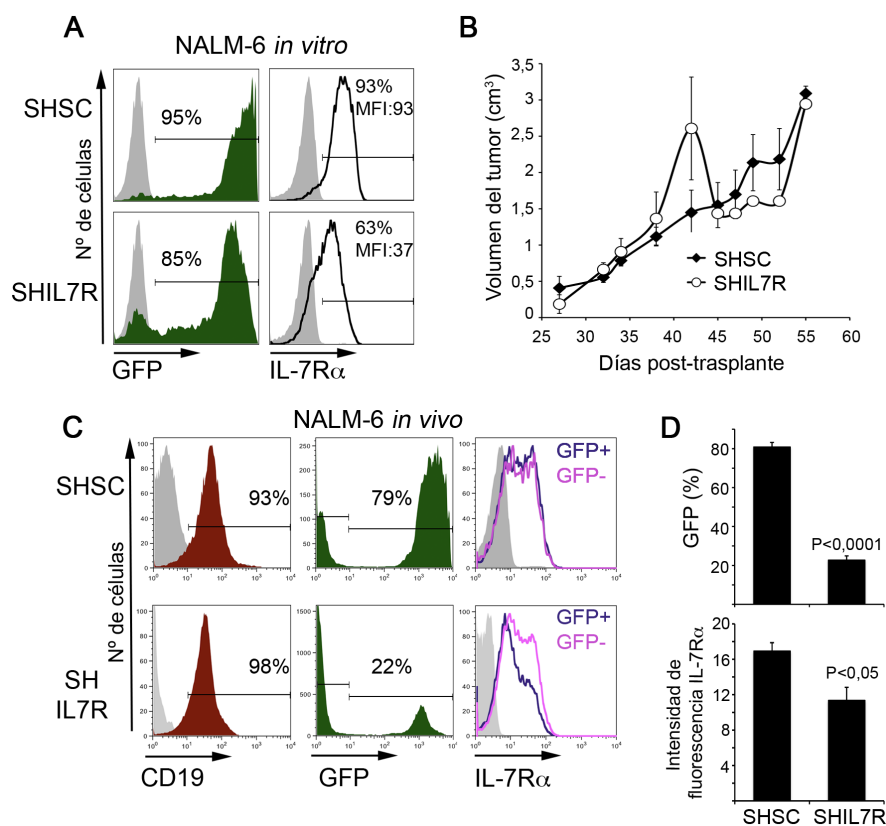
**Figura 24. La expresión del IL-7R es necesaria para el desarrollo tumoral de las T-ALLs *in vivo*.** (A) y (D) Eficiencia de transducción (% de células GFP<sup>+</sup>) y expresión en membrana de IL-7Rα en células HPB-ALL (A) y CUTLL1 (D) infectadas con los vectores shIL7R o shSC, analizadas por citometría de flujo, en el momento de la inyección en ratones Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>. (B) y (E) Caracterización fenotípica, utilizando anticuerpos anti-CD4, de un tumor representativo derivado de cada grupo de las células HPB-ALL (B) y CUTLL1 (E). Los histogramas de la derecha muestran la expresión de IL-7Rα en las células GFP<sup>+</sup> vs. las células GFP<sup>-</sup>. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Los números indican el porcentaje de células positivas. (C) y (F) Cuantificación del porcentaje de células transducidas con shIL7R o shsc control (% de GFP) en los tumores desarrollados *in vivo*. La gráfica inferior en (C) representa la MFI ± SEM de la expresión de IL-7Rα en las células HPB-ALL recuperadas de los tumores generados *in vivo* (n=5). Las barras representan la media ± SEM del análisis de 5 ratones de cada grupo inyectados con HPB-ALL y 2 ratones de cada grupo inyectados con CUTLL1. Se indica la significación estadística de los resultados.

En primer lugar, observamos que todos los ratones inyectados con células T-ALL IL-7R<sup>+</sup>, bien CUTLL1 o HPB-ALL, desarrollaron tumores a partir de la tercera o cuarta semana postrasplante, tanto a partir de células infectadas con shsc como con shIL7R, sin que pudiésemos establecer una diferencia en cuanto al tiempo de aparición del tumor o el volumen del mismo entre las dos condiciones (datos no mostrados). Sin embargo, al analizar los tumores de los ratones inyectados con las células silenciadas, tanto HPB-ALL (**Figura 24B**) como CUTLL1 (**Figura 24E**), observamos la presencia casi exclusiva en los mismos de células GFP<sup>-</sup> no transducidas (75-90%), lo que evidenciaba el reducido potencial oncogénico de las células silenciadas. Por el contrario, los tumores derivados de las líneas transducidas con el shsc control mantenían un porcentaje de células GFP<sup>+</sup> similar al de la mezcla celular inicial (**Figura 24B, C y E, F**), indicativo de un potencial oncogénico equivalente de las células transducidas y no transducidas. Es importante destacar que, al analizar la expresión del IL-7R en las células silenciadas GFP<sup>+</sup> residuales en los tumores, sus niveles de expresión estaban significativamente reducidos con respecto a las células no transducidas o a los controles shsc (**Figura 24C**), lo que demuestra la eficiencia del silenciamiento *in vivo*.

Cuando analizamos la línea pre-B NALM-6 previamente a la inyección, observamos que el silenciamiento con shIL7R reducía la expresión del IL-7R (**Figura 25A**, dcha.), aunque la tasa de crecimiento tumoral *in vivo* fue similar en los ratones trasplantados con células transducidas con shIL7R (85%) o con shsc control (95%) (**Figura 25B**). Sin embargo, todos los tumores generados en el primer grupo estaban formados esencialmente (~80%) por células no transducidas GFP<sup>-</sup> con niveles reducidos de IL-7R $\alpha$ , (**Figura 25C,D**), indicando que las células en las que se había silenciado el IL-7R poseían una desventaja de crecimiento. Por el contrario, las células transducidas con el shsc control proliferaron con la misma eficiencia que las no transducidas. **Por tanto, nuestros datos indican que la expresión del IL-7R es necesaria para el desarrollo *in vivo* de los tumores derivados de ALLs humanas de origen T y pre-B.**

Finalmente analizamos la capacidad tumoral *in vivo* de las células JURKAT, que no expresan niveles detectables del IL-7R en la membrana (**Figura 26A**), como control del estudio. Para ello, se trasplantaron suspensiones heterogéneas de células transducidas con shIL7R (92%) o shsc (96%) (**Figura 26A**), que no mostraron diferencias en los niveles de expresión de IL-7R, como era esperable. Tras su inyección *in vivo*, no observamos diferencias significativas en la tasa de crecimiento tumoral de ambas poblaciones, aunque la cinética de crecimiento tumoral de las

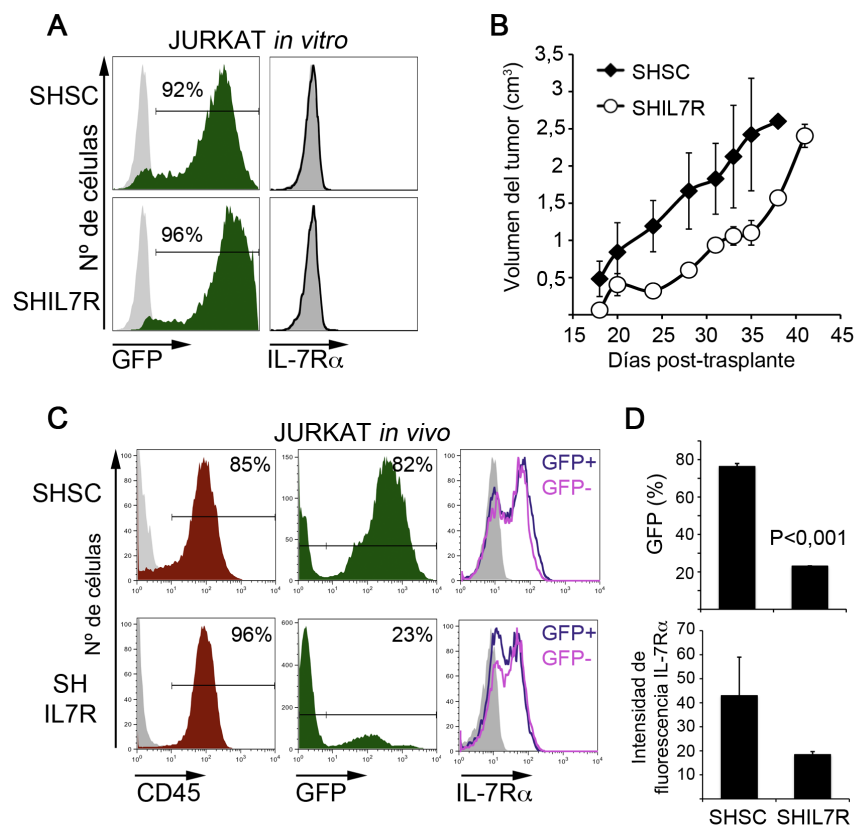
células transducidas con shIL7R fue más retrasada (**Figura 26B**). Sin embargo, al analizar el contenido de los tumores, observamos una contribución minoritaria de las células transducidas con shIL7R al desarrollo tumoral (**Figura 26C,D**). Estos datos eran discordantes con nuestros resultados *in vitro*, que no mostraron un efecto de la infección con shIL7R sobre la capacidad de proliferación de las células JURKAT. Sorprendentemente, la caracterización de las células tumorales expandidas en los ratones mostró que todos los tumores derivados de células JURKAT, tanto las infectadas con el shsc control como con el shIL7R, o incluso las no infectadas, habían



**Figura 25. El silenciamiento de la expresión de IL-7R $\alpha$  reduce la capacidad oncogénica *in vivo* de las leucemias linfoblásticas humanas de origen pre-B. (A)** Eficiencia de la transducción (% de células GFP<sup>+</sup>) y expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en células NALM-6 infectadas con shIL7R o con el shSC control, analizadas por citometría de flujo en el momento de la inyección en ratones Rag2-/- $\gamma$ c-/- . **(B)** Tasa de crecimiento tumoral *in vivo* de las células NALM-6 infectadas como en A. **(C)** Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo de un tumor representativo de cada grupo utilizando anticuerpos anti-CD19 y anti-IL-7R $\alpha$ . El histograma de la izquierda muestra la expresión de IL-7R $\alpha$  en las células GFP<sup>+</sup> y las células GFP<sup>-</sup>. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Se indica el porcentaje de células positivas. **(D)** Cuantificación del porcentaje de células transducidas (% de GFP) (arriba) y de la MFI de la expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  determinada por citometría de flujo (abajo). Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de 3 ratones de cada grupo. Se indica la significación estadística de los resultados.

adquirido la expresión en la membrana de niveles detectables del IL-7R, aunque éstos eran significativamente menores en las últimas (Figura 26C,D). Como consecuencia, la contribución al desarrollo tumoral de las células transducidas con shIL7R era significativamente menor que la de las células control. Por tanto, las células JURKAT capaces de generar tumores *in vivo* adquieren la expresión en la membrana del IL-7R, o alternatively, sólo se expande *in vivo* una población minoritaria de células JURKAT IL-7R<sup>+</sup>. Más importante, el crecimiento de los tumores se ve reducido por el silenciamiento del IL-7R.

En conclusión, la expresión del IL-7R induce una ventaja selectiva para el desarrollo tumoral *in vivo* de las T-ALLs, lo que sugiere su contribución al proceso oncogénico.



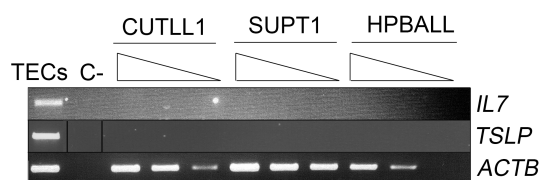
**Figura 26.** Los tumores generados *in vivo* a partir de células JURKAT expresan el IL-7R y el silenciamiento de IL-7Rα afecta a su capacidad de crecimiento. (A) Eficiencia de transducción (% de células GFP<sup>+</sup>) y expresión en membrana de IL-7Rα en células JURKAT infectadas con el vector shIL7R o con el shsc control y analizadas por citometría de flujo en el momento de la inyección en ratones Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>. (B) Tasa de crecimiento tumoral *in vivo* de las células JURKAT infectadas como en A. (C) Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo de un tumor representativo de cada grupo utilizando anticuerpos anti-CD45. El histograma de la derecha muestra la expresión de IL-7Rα en células transducidas GFP<sup>+</sup> y no transducidas GFP<sup>-</sup>. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Se indica el porcentaje de células positivas. (D) Cuantificación del porcentaje de células transducidas (% de GFP) (arriba) y de la MFI de la expresión en membrana de IL-7Rα determinada por citometría de flujo (abajo). Las barras representan la media ± SEM del análisis de 2 ratones de cada grupo. Se indica la significación estadística de los resultados.

## 2.7. Activación constitutiva de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK asociadas al IL-7R en células T-ALL.

La señalización funcional a través del IL-7R es dependiente de la unión de su ligando, IL-7, que induce la dimerización de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  del receptor y la posterior activación de las rutas de señalización asociadas al IL-7R: JAK/STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK. Nuestros resultados *in vivo* son compatibles con una posible función protooncogénica del IL-7R inducida por la IL-7 producida en los ratones trasplantados con las líneas leucémicas. Sin embargo, los experimentos *in vitro* se realizaron sin adición exógena de IL-7, lo que sugiere que las líneas celulares analizadas deben producir IL-7 de forma autocrina. Para analizar esta posibilidad, obtuvimos ARNm total de las líneas CUTLL1, HPB-ALL y SUPT1 y realizamos ensayos de RT-PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos para IL-7, utilizando como control positivo ARNm de células epiteliales tímicas (TECs) que producen IL-7. Como se observa en la **Figura 27**, no detectamos transcritos de IL-7 en las T-ALLs, mientras que las TECs expresaban altos niveles de ARNm para esta citoquina.

La subunidad IL-7R $\alpha$  es compartida por otro receptor de citoquinas, el receptor de la linfopoyetina estromal tímica o TSLP (del inglés, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), lo que plantea la posibilidad de que las T-ALLs pudiesen estar señalizando en respuesta a TSLP a través de su receptor. Analizamos, por tanto, los niveles de transcripción de TSLP en las T-ALLs por RT-PCR y observamos que tampoco producían esta citoquina de forma autocrina (**Figura 27**) ni parecían expresar la cadena específica del receptor de TSLP que dimeriza con IL-7R $\alpha$ , ya que no respondían a la estimulación con TSLP exógena en experimentos de señalización (datos no mostrados).

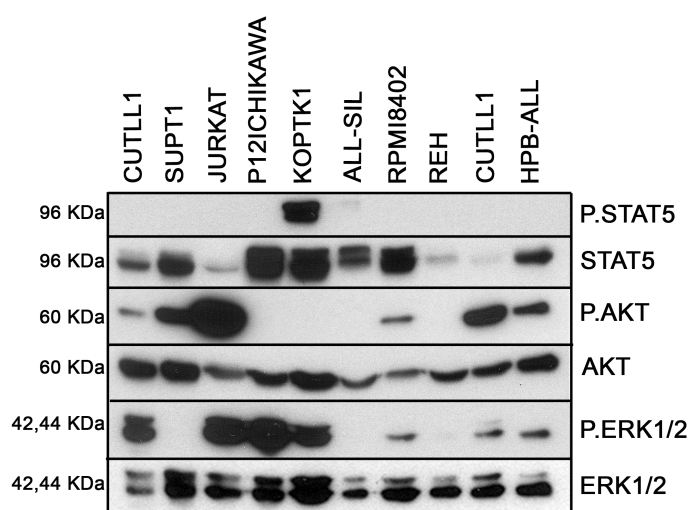
Por tanto, el IL-7R de las T-ALLs parece señalizar independientemente de su ligando, IL-7 o TSLP.



**Figura 27.** Las T-ALLs no transcriben IL-7 ni TSLP de forma autocrina. El ARNm total de las líneas T-ALL indicadas se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa para la expresión de *IL7* y *TSLP*. Se utilizó ARNm de TECs humanas como control positivo. C-, control negativo sin ADNc. Se utilizó la actina- $\beta$  (*ACTB*) como control de la cantidad de ADNc amplificada.

Considerando estos resultados, nuestro siguiente objetivo fue determinar la capacidad de señalización basal del IL-7R en ausencia de la adición de IL-7 en las células leucémicas, para lo cuál analizamos el nivel de activación de las vías

JAK/STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK mediante *Western Blot*. Como se observa en la **Figura 28** todas las líneas T-ALL analizadas mostraban la activación basal de una o varias de las vías de señalización asociadas al IL-7R. Sin embargo, esta activación era independiente de la expresión del IL-7R en la membrana (**Figuras 17 y 19**). De hecho la línea KOPTK1 mostraba fosforilación basal de STAT5 (**Figura 28**), aunque la expresión de IL-7R $\alpha$  era indetectable en la membrana (**Figura 19**). Por tanto, no pudimos establecer una correlación entre la activación basal de las tres vías analizadas y la expresión del IL-7R. No obstante, los datos obtenidos *in vivo* con la línea JURKAT sugieren que el IL-7R podría expresarse en la membrana de algunas T-ALLs a niveles extremadamente bajos, indetectables por las técnicas convencionales de citometría de flujo, pero funcionalmente relevantes. De hecho, varias líneas T-ALL IL-7R $^{-}$  mostraron niveles detectables de ARNm del *IL7R* (**Figura 19B**). Por tanto, decidimos cambiar de estrategia y analizar directamente la participación de cada una de las vías asociadas a la señalización del IL-7R en la proliferación y supervivencia de las T-ALLs, utilizando inhibidores específicos de cada una de ellas, para luego determinar la implicación del IL-7R en su activación.

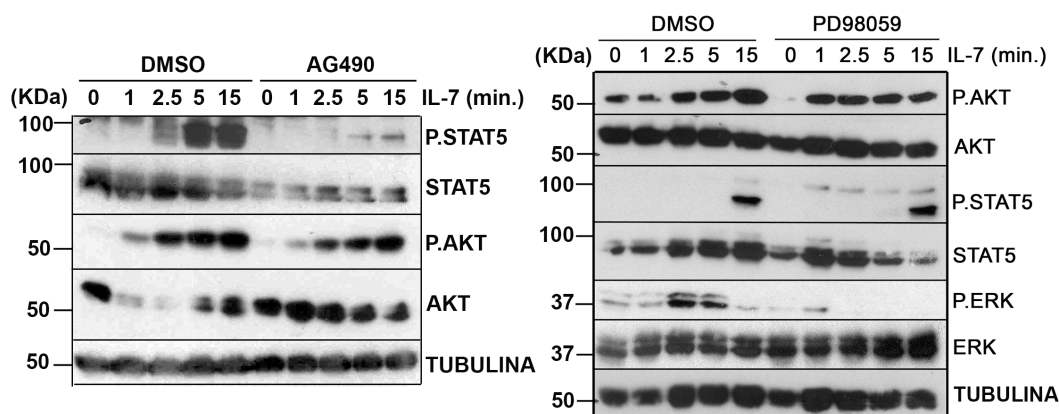


**Figura 28.** Las vías de señalización JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2 se encuentran activadas constitutivamente en células T-ALLs. Análisis mediante *Western Blot* de la fosforilación basal de STAT5, AKT y ERK1/2 en lisados celulares de las líneas indicadas. Se indica el peso molecular correspondiente en kilodaltons (KDa).

En primer lugar, analizamos el efecto de los inhibidores de JAK (AG490), de MEK (PD98059) y de PI3K (Wortmanina) utilizando células estimuladas con IL-7, para comprobar que cada uno de ellos era capaz de bloquear la activación específica de su vía y no influía en las demás. Observamos que el inhibidor AG490 bloqueaba la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7, pero no afectaba ni a la activación de AKT ni a la de ERK1/2 (**Figura 29**).

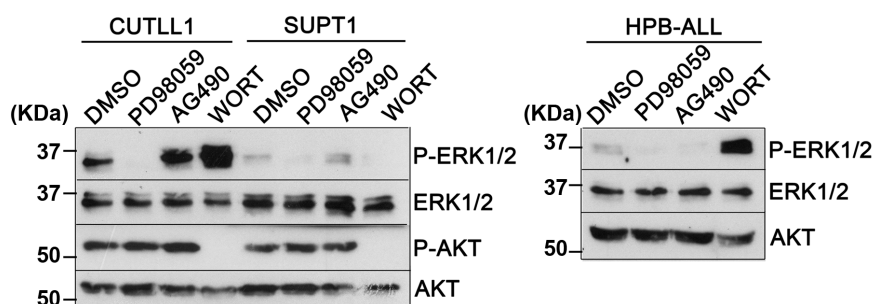


También comprobamos la especificidad del fármaco PD98059, y observamos que inhibía la fosforilación de ERK1/2 inducida por IL-7 pero no la del resto de las vías (**Figura 29**); así como la del inhibidor de PI3K, Wortmanina, (datos no mostrados).



**Figura 29.** Análisis de la especificidad de los inhibidores de JAK y MEK en células T-ALL activadas con IL-7. Las células CUTLL1 se incubaron con los inhibidores de JAK (AG490, 50 $\mu$ M) y MEK (PD98059, 50 $\mu$ M) o DMSO como control, durante una hora y se estimularon posteriormente con 200IU/ml de rhIL-7 en presencia de los inhibidores, a los tiempos indicados. Se analizó mediante SDS-PAGE y *Western Blot* la activación de fosfo-proteínas de las vías JAK/STAT, PI3K y MAPK/ERK1/2.

Seguidamente analizamos el efecto de estos inhibidores sobre la activación basal de estas vías, sin estimulación con IL-7 exógena. Como se muestra en la **Figura 30**, el tratamiento con los diferentes inhibidores bloqueó cada una de las vías de forma específica en condiciones basales, sin alterar los niveles de activación de las demás. Una vez establecido el efecto de los inhibidores sobre las vías de activación del IL-7R en las T-ALLs, analizamos su impacto sobre la supervivencia y la proliferación de las mismas, exceptuando la vía JAK/STAT5, ya que todas las líneas, excepto KOPTK1, carecen de activación basal de esta vía.

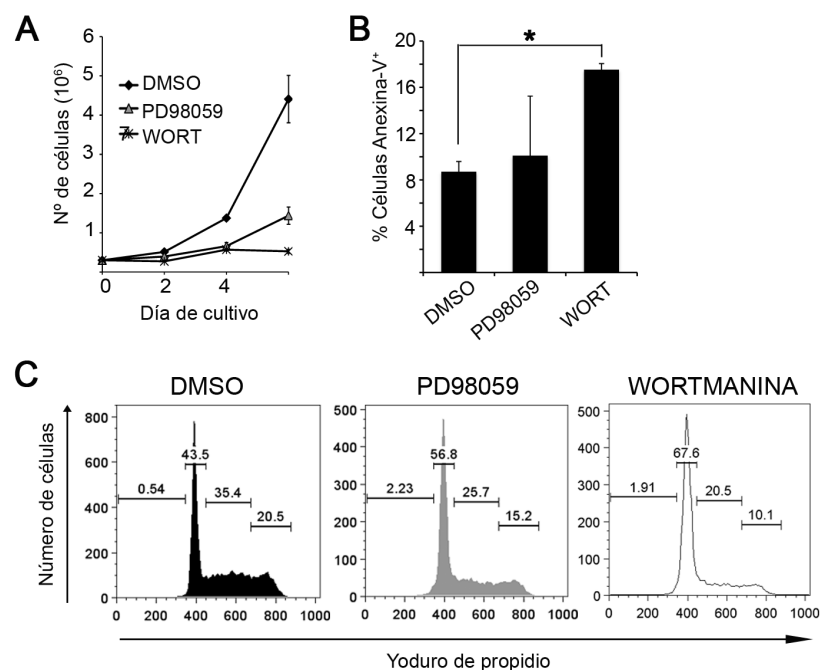


**Figura 30.** Análisis de la especificidad de los inhibidores de JAK, MEK y PI3K sobre la activación basal de las vías STAT5, PI3K y ERK1/2. Las células CUTLL1 se incubaron con los inhibidores de JAK (AG490, 50 $\mu$ M), MEK (PD98059, 50 $\mu$ M) o PI3K (Wortmanina, Wort, 5mM) o DMSO como control, durante una hora y se analizó mediante *Western Blot* la activación de fosfo-proteínas de las vías JAK/STAT, PI3K y MAPK/ERK.



Cuando tratamos la línea CUTLL1 con los inhibidores PD98059 y Wortmanina observamos que ambos compuestos provocaban un bloqueo de la expansión celular a lo largo del cultivo, ya que el número de células recuperadas a los diferentes días fue siempre menor que en el cultivo control tratado con DMSO (**Figura 31A**). Conforme a este dato, los análisis de marcaje con Anexina-V por citometría de flujo mostraron una marcada entrada en apoptosis de las células tratadas con Wortmanina (hasta un 20% de células Anexina-V<sup>+</sup>) (**Figura 31B**). Sin embargo, la inhibición de ERK por PD98059 no incrementó sustancialmente la apoptosis. En cuanto al efecto de los inhibidores sobre el ciclo celular, observamos en ambos casos una parada en la fase G0/G1 y una reducción del número de células en división (fases S+G2/M) (**Figura 31C**).

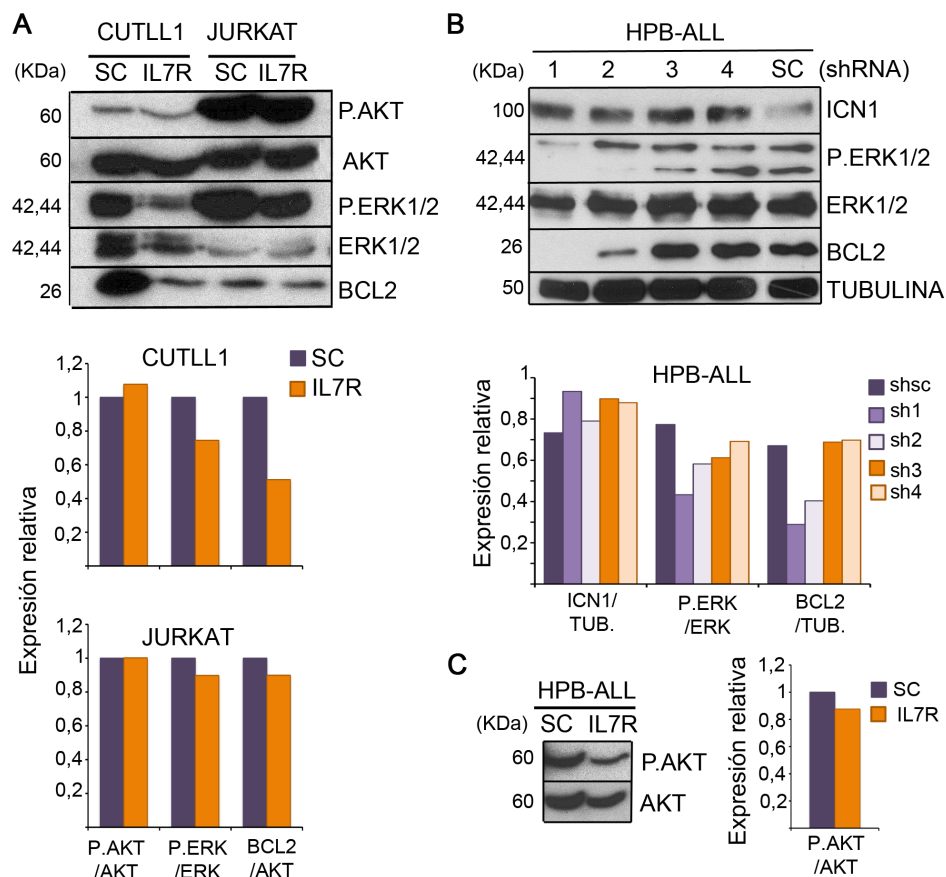
Podemos concluir, por tanto, que diferentes T-ALLs muestran una activación basal de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, que desempeñan una papel crítico en la supervivencia (PI3K/AKT) y la proliferación celular (PI3K/AKT y MAPK/ERK).



**Figura 31. Efecto de los inhibidores de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK sobre el ciclo celular y la viabilidad de las T-ALLs.** Las células CUTLL1 se trataron con PD98059 (50µM) o Wortmanina (5mM) o con DMSO como control. (A) Números de células totales recuperados tras 7 días de tratamiento. (B) Porcentaje de células apoptóticas analizadas por tinción con Anexina-V<sup>+</sup> mediante citometría de flujo, tras 72h de tratamiento. \* p<0,05 (C) Ciclo celular analizado por tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo, a las 72h del tratamiento.

## 2.8. El silenciamiento del IL-7R en T-ALLs bloquea la activación basal de ERK.

Para establecer un posible nexo entre la activación basal de las vías analizadas y la expresión del IL-7R en las T-ALLs, quisimos determinar si el silenciamiento del IL-7R podría afectar específicamente a alguna de estas vías de señalización. EL objetivo final era identificar las vías responsables de la proliferación y supervivencia dependiente del IL-7R de las leucemias estudiadas. Para ello, obtuvimos lisados en condiciones basales, sin estimulación con IL-7, de las células CUTLL1, HPB-ALL y JURKAT transducidas con el shIL-7R o con el shsc control y realizamos ensayos de *Western Blot* para determinar los niveles basales de fosfo-proteínas de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK. De nuevo, no se observó activación basal de la vía JAK/STAT5 (datos no mostrados), pero sí de las otras dos.



**Figura 32. El silenciamiento de IL-7R $\alpha$  en T-ALLs reduce los niveles basales de P.ERK1/2 y de BCL2.** (A) Análisis por *Western Blot* (arriba) y cuantificaciones relativas (abajo) de lisados celulares totales obtenidos en condiciones basales de células CUTLL1 y JURKAT transducidas con shIL-7R (IL7R) o shsc (SC), y seleccionadas con puromicina durante 4 días tras las transducción. (B) Análisis por *Western Blot* (arriba) y cuantificaciones relativas (abajo) de lisados celulares totales obtenidos en condiciones basales de células HPB-ALL transducidas con cuatro de los shIL-7R (1-4) (IL7R) o shsc (SC) control, y seleccionadas con puromicina durante 4 días tras las transducción. (C) Análisis por *Western Blot* (izqda.) y cuantificaciones relativas (dcha.) de lisados celulares totales obtenidos en condiciones basales de células HPB-ALL transducidas con shIL-7R (IL7R) o shsc (SC), y seleccionadas con puromicina durante 4 días tras las transducción. Se indica el peso molecular de cada una de las proteínas en kilodaltons (KDa).

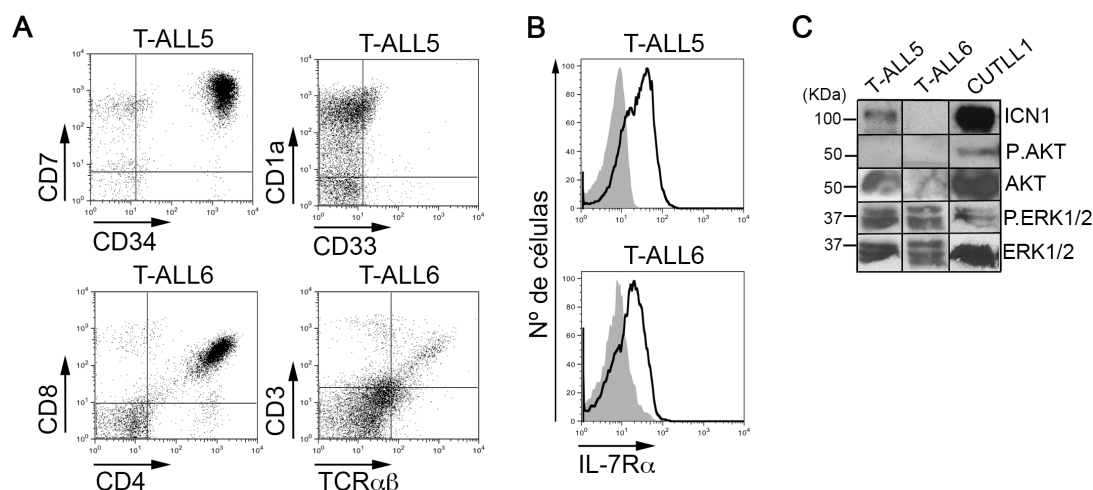
Como muestra la **Figura 32A, B y C**, los niveles de fosforilación ERK1/2, pero no los de AKT, se vieron afectados por el silenciamiento del IL-7R, en las líneas CUTLL1 y HPB-ALL, sin que se afectaran las células JURKAT. Como cabía esperar, el silenciamiento del IL-7R resultó además en una reducción significativa de los niveles de la proteína antiapoptótica BCL2, que es una diana clásica del IL-7R (**Figura 32**), lo que explica el efecto proapoptótico del silenciamiento del IL-7R observado (**Figura 22**). Cabe destacar que la apoptosis inducida por el shIL7R es independiente de la señalización a través de Notch1, ya que los niveles de ICN1 endógeno se mantuvieron estables tras el silenciamiento del IL-7R (**Figura 32B**).

Por tanto, el silenciamiento de IL-7R $\alpha$  inhibe la activación basal de la vía de ERK1/2 en T-ALLs.

## 2.9. Activación constitutiva de la vía MAPK/ERK en T-ALLs primarias que expresan IL-7R.

En conjunto nuestros resultados demuestran que gran parte de las líneas T-ALL que presentan mutaciones activadoras en *NOTCH1* expresan el IL-7R y activan constitutivamente las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, asociadas a la señalización a través del IL-7R. De estas vías, la de MAPK/ERK parece ser la principal afectada cuando se silencia la expresión del IL-7R $\alpha$  mediante shRNA. Para investigar la relevancia de la activación constitutiva de ERK en la fisiopatología de las T-ALLs, decidimos investigar el estado de activación de esta vía en células primarias procedentes de pacientes diagnosticados de T-ALL. Se obtuvieron muestras de médula ósea (Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario de la Princesa, previo consentimiento informado), que se analizaron fenotípica y molecularmente para la expresión del IL-7R y de la forma activa de Notch1 (ICN1), respectivamente. En la **Figura 33A**, se muestra el fenotipo de dos de las muestras T-ALL analizadas, constituidas por células del fenotipo pre-T CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>CD33<sup>-</sup> (T-ALL5) o del fenotipo DP CD3<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$  en el caso de la muestra T-ALL6. Ambas expresaban niveles intermedios de IL-7R $\alpha$  en la membrana (**Figura 33B**). Al analizar la activación de la vía de Notch1 mediante *Western Blot*, observamos que las células expresaban la forma intracelular activa ICN1 (**Figura 33C**). Más importante, ambas leucemias T-ALL primarias, al igual que las líneas celulares T-ALL, presentaban una activación constitutiva de la vía MAPK/ERK, como demostraban los niveles de fosfo-ERK1/2 (**Figura 33C**), sin que pudiésemos detectar activación constitutiva de PI3K (**Figura 33C**) o de la vía JAK/STAT (datos no mostrados).

Por tanto, la activación constitutiva de la vía MAPK/ERK confirma la relevancia de los datos obtenidos con las líneas derivadas de T-ALLs y sugieren un importante papel de la activación de ERK ligada a la expresión del IL-7R en la fisiopatología de las leucemias T-ALL.

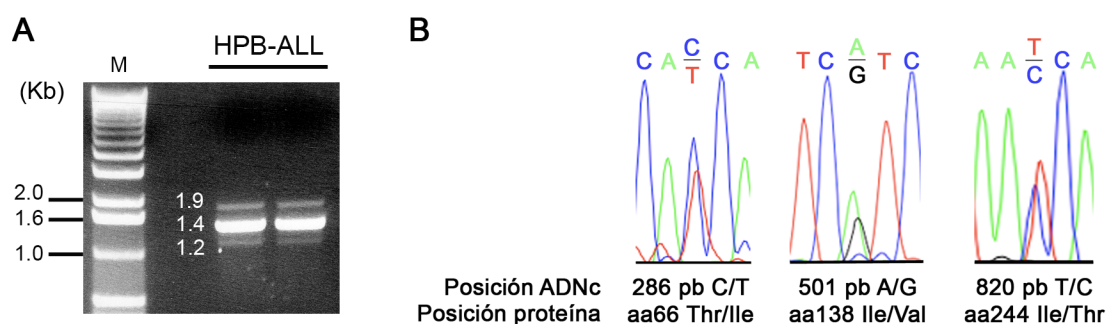


**Figura 33.** Las T-ALLs primarias expresan el IL-7R y poseen una activación basal constitutiva de ERK1/2. Muestras procedentes de médula ósea de pacientes diagnosticados de T-ALL. (A) Caracterización fenotípica por citometría de flujo. (B) Expresión en membrana de IL-7Rα. El histograma sombreado muestra la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. (C) Detección del estado de activación basal de las vías de Notch1 (ICN1) y MAPK/ERK mediante *Western Blot*. Se utilizó la línea celular CUTLL1 como control positivo de la expresión de ICN1 y fosfo-ERK1/2 (P.ERK1/2). Se muestra el peso molecular en kilodaltons (KDa).

## 2.10. Identificación de polimorfismos de un único nucleótido en el gen *IL7R* de las T-ALLs.

Una posibilidad que podría explicar la dependencia de las T-ALLs de la expresión del IL-7R, es la presencia de mutaciones que permitan la activación constitutiva de la vía en ausencia de IL-7. Para abordar esta hipótesis, realizamos ensayos de secuenciación con oligonucleótidos que cubrían todo el ARNm del *IL7R* (ver Materiales y Métodos, *Tabla 4*), en varias líneas humanas T-ALL, en donde amplificamos el *IL7R* mediante PCR. Utilizando los oligonucleótidos 441 y 442, que amplifican la región codificante del *IL7R*, obtuvimos hasta tres bandas de diferente tamaño en la reacción de PCR según la línea celular analizada. En la *Figura 34A* se muestra un ejemplo correspondiente a la línea HPB-ALL. Purificamos y clonamos cada una de estas bandas por separado y hallamos que la banda de tamaño intermedio (~1,4 Kb) correspondía con la secuencia salvaje descrita para el *IL7R* en las bases de datos (Número de acceso de GenBank, NM\_002185.2). La banda de

menor tamaño (~1,2 Kb) correspondía a una isoforma del *IL7R* descrita previamente que carece del dominio transmembrana (Goodwin *et al.*, 1990; Pleiman *et al.*, 1991) y que genera un IL-7R soluble capaz de unir IL-7. La banda de mayor tamaño no parecía corresponder con el transcrito del *IL7R*, ya que la secuencia obtenida enfrentada a la descrita para *IL7R* no mostraba ninguna coincidencia.



**Figura 34.** Las T-ALLs expresan transcritos de diferente tamaño del *IL7R* que poseen SNPs. (A) Amplificación por PCR de la región codificante del *IL7R* en la línea HBP-ALL. Se indican los tamaños del marcador de peso molecular (M) y los tamaños aproximados de los tres transcritos, en kilobases (Kb). (B) Se muestra la secuencia de ADNc y los cambios nucleotídicos en un único residuo (SNP) y aminoácidos correspondientes al transcrito de 1,4Kb del *IL7R* de HPB-ALL.

No hallamos ninguna mutación del tipo inserción, delección o traslocación en las muestras analizadas, pero sí una serie de cambios nucleotídicos que aparecían en heterocigosis (se muestra un ejemplo en la **Figura 34B**) y que, tras consultar las bases de datos, pudimos definir como polimorfismos de un único nucleótido o SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polimorphisms*). La **Tabla 8** muestra un resumen de los SNPs identificados en distintas líneas T-ALL.

En colaboración con el Dr. Adolfo A. Ferrando (Columbia University, NY) corroboramos la presencia de estos SNPs en muestras primarias de T-ALLs, analizando un panel de 83 muestras de ADN de pacientes diagnosticados de T-ALL. En la **Figura 35** se muestra un esquema de la localización de estos SNPs en la región codificante del *IL7R* y en la **Tabla 8** se describe el polimorfismo y su frecuencia de aparición en las muestras analizadas, tanto de T-ALLs primarias como de líneas celulares. También se incluyó en el estudio la línea celular pre-B-ALL REH, en la que también se detectó la presencia de varios SNPs (**Tabla 8**).

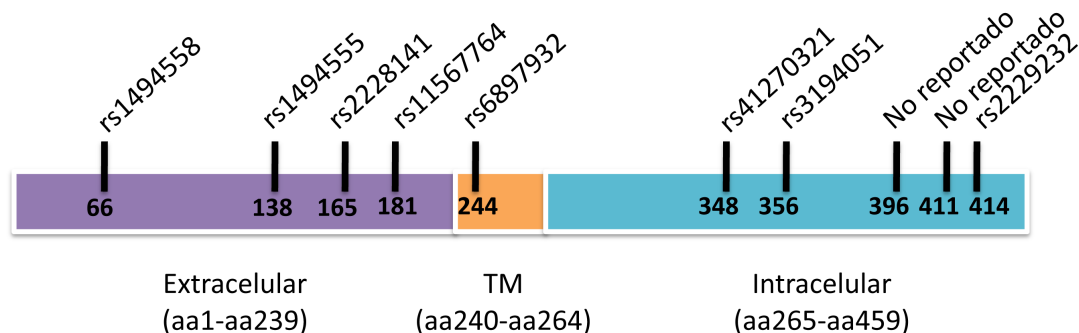


Figura 35. Esquema de los SNPs identificados en la región codificante del *IL7R* humano (NM\_002185.2). Se indican los diferentes dominios (extracelular, transmembrana o TM, e intracelular) y los aminoácidos (aa) correspondientes a cada uno. Así mismo, se muestra el código del SNP según la base de datos del NCBI y el aa afectado. Dos SNPs no habían sido previamente reportados.

Código SNP	Posición/ Cambio ARNm	Posición/ Cambio Proteína	Líneas T-ALL Positivas (Frec.)	Frecuencia Pacientes T-ALLs	Hetero- cigosidad
rs1494558	286 T>C	66 I>T	REH,SUPT1,JURKAT,HPBALL, CUTLL1 (1,00)	0,891	0,462
rs1494555	501 G>A	138 V>I	REH,SUPT1,JURKAT,HPBALL, CUTLL1 (1,00)	0,934	0,410
rs2228141	584 C>T	165 H>H	No detectado	0,229	0,227
rs11567764	650 G>A	187 K>K	No detectado	0,036	0,097
rs6897932	820 C>T	244 T>I	JURKAT, HPBALL (0,40)	0,373	0,280
rs41270321	1132 A>C	348 N>NT	No detectado	0,036	0,500
rs3194051	1155 A>G	356 I>V	REH,SUPT1,CUTLL1 (0,60)	0,554	0,380
No reportado	1277 T>C	396 N>N	No detectado	0,012	-
No reportado	1320 A>G	411 T>A	No detectado	0,012	-
rs2229232	1330 C>T	414 T>M	No detectado	0,024	0,065

Tabla 8. Polimorfismos de un único nucleótido (SNP) hallados en la secuenciación del *IL7R* de muestras primarias de T-ALL y líneas celulares derivadas de T-ALLs. Se indica el código de referencia del SNP según la base de datos de NCBI; la posición y el cambio de nucleótido en el ARNm (NM\_002185); la posición y el cambio de aminoácido en la proteína; las líneas celulares en las que se detectó cada SNP y su frecuencia de aparición; la frecuencia de aparición en muestras de T-ALLs primarias (de un total de 83 pacientes) así como la frecuencia de heterocigosidad de cada SNP según la base de datos del NCBI.

En resumen, la cadenas IL-7R $\alpha$  presentes en las T-ALLs analizadas presentan diferentes SNPs pero carecen de inserciones, delecciones o traslocaciones.

### 2.11. Los SNPs del *IL7R* no dotan de ninguna característica diferencial a los IL-7Rs de las T-ALLs.

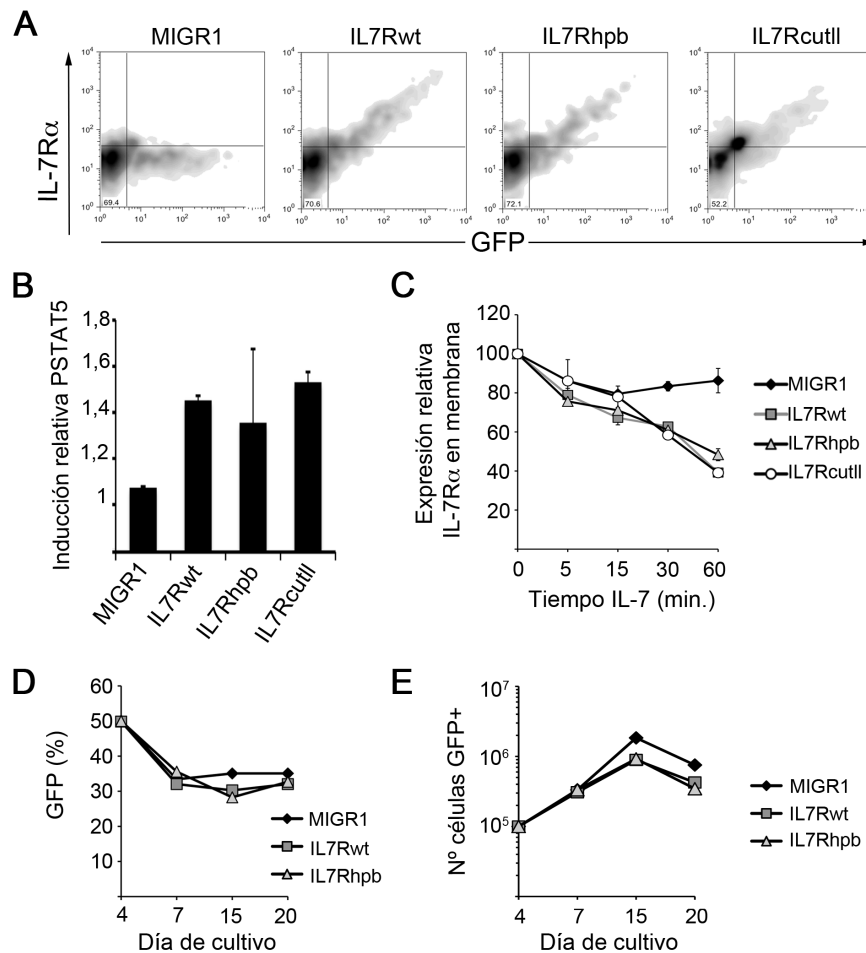
Nuestro siguiente objetivo fue analizar si los SNPs identificados podrían conferir alguna característica específica a la cadena IL-7R $\alpha$  que permitiese una activación basal de la vía del IL-7R en las T-ALLs. Para ello, clonamos el ADNc del *IL7R* de las líneas HPB-ALL (IL7Rhpb) y CUTLL1 (IL7Rcutll) en el vector retroviral MigR1, portador de GFP. Utilizamos como control la secuencia de la cadena *IL7R* amplificada de timocitos humanos, en donde no se halló la presencia de ninguno de los SNPs que se han descrito anteriormente (denominada wt, del inglés *wild type*). En primer lugar, analizamos si existía una capacidad de respuesta diferencial a IL-7 entre los diferentes receptores. Para ello, transfectamos de manera transitoria los tres receptores en células JURKAT (que carecen *in vitro* de la expresión del IL-7R) y, tras 24 horas, estimulamos las células transfectadas con IL-7 y analizamos por tinción intracelular y citometría de flujo los niveles de fosforilación de STAT5, indicativos de la señalización inducida por IL-7. Como se muestra en la **Figura 36A**, las células transfectadas con las diferentes construcciones expresaban el IL-7R correspondiente en la membrana, pero tras la estimulación con IL-7 no detectamos diferencias significativas en la fosforilación de STAT5 en los diferentes transfectantes (**Figura 36B**), lo que indica una capacidad de señalización similar de los diferentes receptores.

En segundo lugar, analizamos la posibilidad de que los SNPs pudiesen conferir una mayor estabilidad en membrana a IL-7R $\alpha$ . Se ha descrito recientemente que IL-7R $\alpha$  se internaliza tras la activación con IL-7 (Henriques *et al.*, 2010). Realizamos, por tanto, experimentos de internalización con las células JURKAT transfectadas con los diferentes receptores, que se estimularon con IL-7 a diferentes tiempos y analizamos por citometría de flujo los niveles de expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  a diferentes tiempos, sin que observásemos ninguna diferencia en la cinética de internalización de los diferentes receptores (**Figura 36C**).

Finalmente analizamos el efecto de los SNPs identificados en T-ALLs sobre el desarrollo de timocitos humanos primarios. Para ello, transdujimos progenitores intratímicos ETPs con un vector retroviral codificante para GFP, IL7Rwt o IL7Rhpb y los cultivamos sobre el estroma OP9-huDL1 en presencia de las citoquinas Flt3l e IL-7. No observamos ninguna ventaja inducida por la sobreexpresión de los distintos IL-7Rs sobre la proliferación de los ETPs (**Figura 36D, E**) ya que la recuperación celular fue similar en las diferentes condiciones. Tampoco detectamos un efecto selectivo



del IL7Rhp sobre la diferenciación de las células transducidas con respecto a las células transducidas con el IL7Rwt o con GFP (datos no mostrados). Estos datos indican que los SNPs presentes en el *IL7R* en las T-ALLs no confieren una ventaja proliferativa en respuesta a IL-7 a los progenitores intratímicos humanos.



**Figura 36. Los SNPs del *IL7R* presentes en T-ALLs no confieren una ventaja proliferativa.** Expresión del IL-7R procedente de timocitos primarios (IL7Rwt), células HPB-ALL (IL7Rhp) o células CUTLL1 (IL7RcutII) en células JURKAT transfectadas transitoriamente con el vector retroviral que codifica para cada uno de los receptores o el vector vacío control MigR1 y análisis por citometría de flujo de: (A) Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  vs. GFP, (B) inducción relativa de fosfo-STAT5 tras 30 min. de estimulación con 100IU/ml de rhIL-7, (C) cinética de expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  tras estimulación a 37°C con rhIL-7 como en (B). (D) y (E) ETPs humanos transducidos con GFP (MIGR1), IL7R procedente de timocitos primarios (IL7Rwt) o de células HPB-ALL (IL7Rhp) y cultivados sobre OP9-huDL1 en presencia de rhIL-7 y rhFl3tl. (D) Números relativos de células transducidas (GFP $^{+}$ ) durante el cultivo. (E) Números absolutos de células transducidas (GFP $^{+}$ ) recuperados a los días indicados y relativizados a  $10^5$  células iniciales.

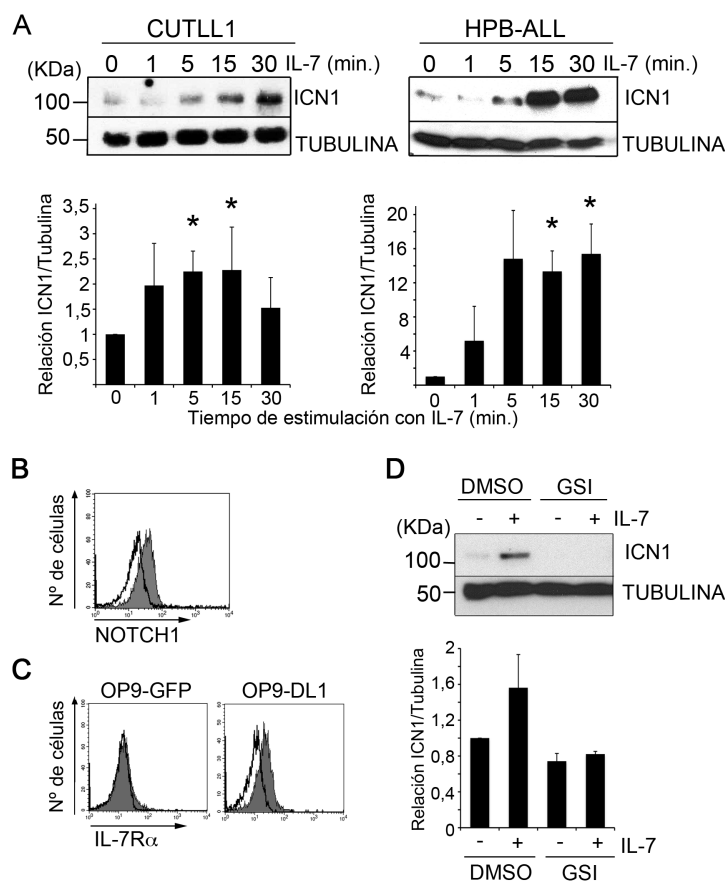


### 3. La señalización vía IL-7R induce la activación de Notch1 dependiente de ADAMs y ERK en T-ALLs.

#### 3.1. La activación vía IL-7R aumenta los niveles endógenos de ICN1 en T-ALLs.

Los resultados hasta ahora mostrados indican que Notch1 regula directamente la expresión del IL-7R en timocitos humanos y líneas T-ALLs, y que la expresión de IL-7R en las T-ALLs es necesaria para su supervivencia y proliferación. Dado que Notch1 es esencial también para el mantenimiento de estas T-ALLs, nos planteamos investigar si podría existir un mecanismo cooperativo de regulación positiva entre Notch1 y el IL-7R. En concreto, quisimos analizar las consecuencias que la señalización vía IL-7R pudiese tener sobre los niveles de activación de Notch1. Para abordar esta hipótesis, analizamos los niveles de activación de Notch1 en las T-ALLs en condiciones basales y tras la estimulación con IL-7. Para detectar la activación de Notch1 utilizamos un anticuerpo anti-ICN1, que reconoce la forma activa del receptor Notch1. Como se muestra en la **Figura 37A**, la estimulación con IL-7 de las líneas IL-7R<sup>+</sup> provocaba un incremento de los niveles endógenos de ICN1 a tiempos tempranos (1-5min.). Cabe destacar que estas líneas poseen mutaciones activadoras en *NOTCH1* que inducen la activación de Notch1 independiente de ligando pero dependiente de ADAMs y  $\gamma$ -secretasas, lo que explica la detección de niveles basales de ICN1 en células sin estimular. Por tanto, parece probable que el incremento de ICN1 inducido vía IL7/IL-7R fuese también dependiente de ADAMs y  $\gamma$ -secretasas. Finalmente, quisimos determinar si la señalización a través del IL-7R era también capaz de incrementar la activación de Notch1 dependiente de la interacción con su ligando. Para ello, utilizamos la células JURKAT, en la que no se detecta ICN1 constitutivamente (**Figura 8D**) pero que expresa el receptor Notch1 en la membrana (**Figura 37B**) y la cultivamos sobre células estromales OP9 en las que se expresó el ligando de Notch, Delta-like1 (OP9-mDL1) o sobre un estroma control OP9-GFP, en presencia o ausencia de IL-7. Tras el cultivo sobre OP9-mDL1 las células JURKAT expresaron el IL-7R (**Figura 37C**) y detectamos la inducción de ICN1 (**Figura 37D**) y ésta se incrementó significativamente en presencia de IL-7 (**Figura 37D**).

En conjunto, podemos concluir que la señalización a través de la vía IL-7/IL-7R induce un aumento de la activación dependiente o independiente de ligando de Notch1 en T-ALLs.



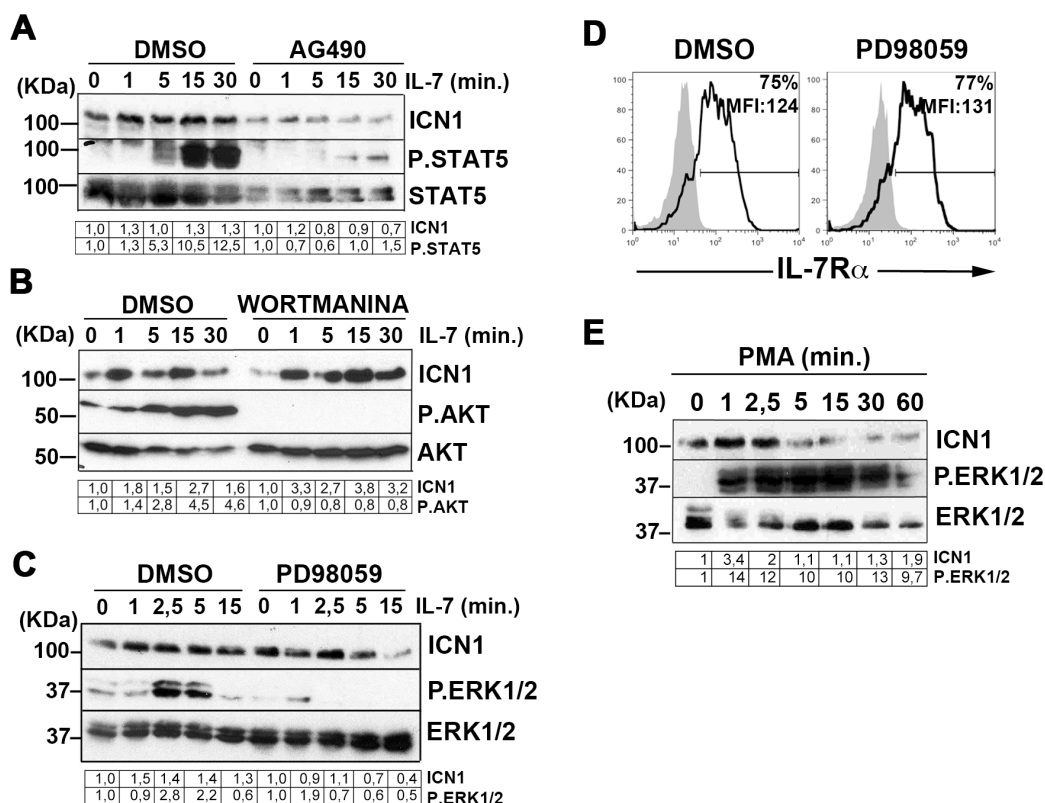
**Figura 37. La señalización por IL-7R incrementa los niveles de ICN1 en T-ALLs.** (A) Detección de ICN1 mediante *Western Blot* en células CUTLL1 y HPB-ALL estimuladas con 200IU/ml de rhIL-7. Se utilizó tubulina como control de carga. Se muestra la cuantificación relativa de la expresión de ICN1 normalizada para la expresión de tubulina a cada tiempo. (B) Expresión en membrana de Notch1 en células JURKAT analizada por citometría de flujo. (C) Expresión en membrana de IL-7Rα en células JURKAT cultivadas 16h sobre OP9-GFP u OP9-mDL1 analizada por citometría de flujo. (D) Detección por *Western Blot* de ICN1 en células JURKAT cultivadas 16h sobre OP9-mDL1 en presencia de DMSO o GSI (100nM), en presencia o en ausencia de IL-7 (200IU/ml). Se muestra la cuantificación relativa de la expresión de ICN1 normalizada para la expresión de tubulina de cada condición. \*  $p < 0,05$

### 3.2. La activación de Notch1 inducida vía IL-7 es dependiente de ERK.

Para determinar el mecanismo implicado en la activación de Notch1 inducida por IL-7, analizamos la participación de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK en el proceso, utilizando inhibidores específicos. Tratamos las células con los inhibidores de cada una de las vías, las estimulamos con IL-7, y analizamos mediante *Western Blot* los niveles de ICN1, en comparación con los controles tratados con DMSO. Como se muestra en la **Figura 38**, no observamos un efecto significativo sobre la inducción de ICN1 dependiente de IL-7 tras la inhibición de JAK/STAT (**Figura 38A**) o de PI3K/AKT (**Figura 38B**), lo que sugiere que ninguna de estas vías está implicada en el proceso. Por el contrario, la inhibición de MAPK/ERK bloqueó la inducción de ICN1 mediada por IL-7 (**Figura 38C**), sin que se apreciara la afectación de los niveles del IL-7R (**Figura 38D**), lo que sugiere la participación de la vía de ERK en la activación de Notch1 dependiente del IL-7R.

La vía MAPK/ERK puede ser activada directamente por ésteres de forbol lo que nos permitió analizar si la activación de esta vía con PMA era suficiente para inducir ICN1. Como se muestra en la **Figura 38E**, la estimulación con PMA indujo un

incremento notable de ICN1 sobre los niveles de expresión basal, confirmando la implicación de ERK1/2 en esta activación. De estos datos se concluye que la vía ERK está implicada en la activación de Notch1 inducida por el IL-7R.

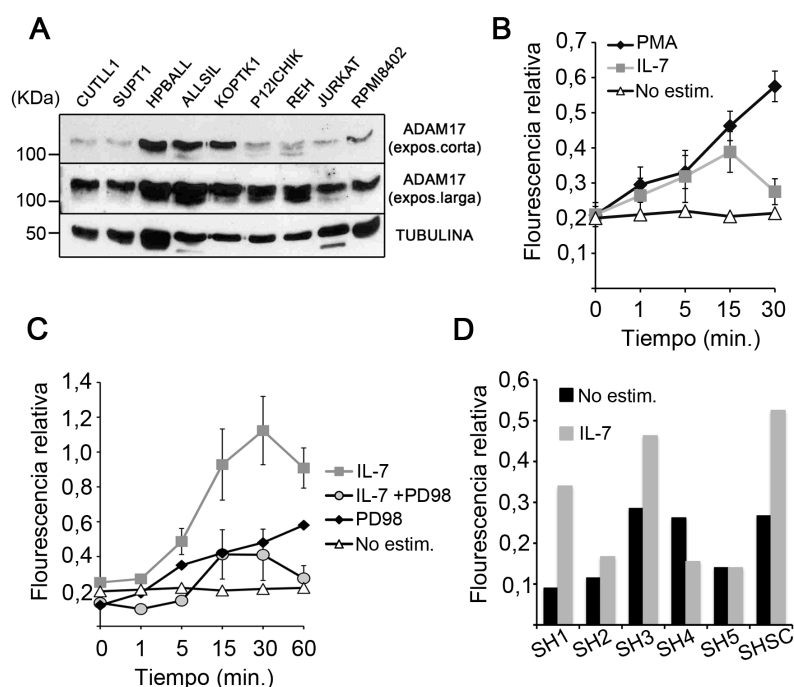


**Figura 38.** La señalización a través del IL-7R incrementa los niveles de ICN1 vía ERK1/2. Estimulación de células CUTLL1 con rIL-7 (200IU/ml) y detección mediante *Western Blot* de la cinética de expresión de las proteínas indicadas en presencia de (A) AG490 50 $\mu$ M, (B) Wortmanina 5mM, (C) PD98059 50 $\mu$ M. En todos los casos se utilizó DMSO como control y se hizo un pre-tratamiento de 1h a 37°C. (D) Análisis por citometría de flujo de la expresión de IL-7R $\alpha$  en células CUTLL1 tratadas 1h con 50 $\mu$ M PD98059 o DMSO como control. El histograma sombreado representa la tinción con un anticuerpo isotípico control. (E) Análisis por *Western Blot* de la cinética de expresión de ICN1, ERK1/2 y P.ERK1/2 de CUTLL1 estimuladas con PMA (50ng/ml) a los tiempos indicados. Las tablas representan las cuantificaciones relativas del experimento mostrado, relativizando la intensidad de la banda de ICN1 y las fosfo-proteínas indicadas con respecto a los niveles de proteína total de STAT5 (A), AKT (B) y ERK (C,D).

### 3.3. La señalización vía IL-7/IL-7R incrementa la actividad basal de las ADAMs de manera dependiente de ERK.

Se ha descrito en diferentes sistemas que ERK1/2 es capaz de fosforilar el dominio intracelular de ADAM17 (TACE) e inducir su actividad. Se sabe también que ADAM17 es la principal metaloproteasa implicada en la activación de Notch1 inducida de forma independiente de ligando (Bozkulak y Weinmaster, 2009). Dado que las T-ALLs expresan ADAM17 (Figura 39A), quisimos analizar la contribución de esta

metaloproteasa a la activación de Notch1 inducida por IL-7. Para ello, utilizamos un ensayo enzimático de cuantificación de la actividad de ADAM en células HPB-ALL estimuladas con IL-7 o con PMA, como control positivo. Como se muestra en la **Figura 39B** observamos un incremento significativo de la actividad ADAM a tiempos cortos (15min.) tras la estimulación con IL-7, que seguía una cinética paralela a la de células control estimuladas con PMA. Para comprobar si la inducción de la actividad ADAM por IL-7 estaba mediada por ERK, utilizamos seguidamente el inhibidor de MEK PD98059 en el ensayo y observamos un bloqueo drástico de la actividad de ADAM tras la estimulación con IL-7 (**Figura 39C**), lo que confirma la implicación de ERK en la activación de ADAMs inducida por IL-7.



**Figura 39. La señalización vía IL-7R induce la activación de ADAMs dependiente de ERK.** (A) Detección de proteína ADAM17 mediante *Western Blot* en diferentes líneas T-ALL. Se muestran dos exposiciones diferentes de la membrana. Se utilizó tubulina como control de carga. (B) Ensayo enzimático de la actividad ADAM. Células HPB-ALL se incubaron en presencia de un sustrato fluorescente de ADAM y se estimularon a los tiempos indicados con 200IU/ml de rhIL-7, 50ng/ml de PMA, o sin estimular. (C) El ensayo enzimático se realizó como se describe en (B) en células suplementadas con 200IU/ml de rhIL-7 en presencia o ausencia del inhibidor de ERK PD98059 (50μM). Se representan las medias de fluorescencia de al menos 3 experimentos independientes. (D) Ensayo de actividad ADAM en células HPB-ALL transducidas con lentivirus portadores de los shRNAs (1-5) frente a IL-7R o de un shsc control estimuladas o no con rhIL-7, durante 20 min.

Finalmente corroboramos la implicación específica del IL-7R en este proceso en experimentos utilizando células HPB-ALL transducidas con los diferentes shRNAs

frente al *IL7R*. En la **Figura 39D** se muestra que el silenciamiento del IL-7R redujo significativamente la activación de ADAMs en respuesta a IL-7. En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de Notch1 mediada por IL-7 en T-ALLs se debe a un aumento de la actividad ADAM dependiente de ERK.



***DISCUSIÓN***





## 1. Regulación de la expresión del IL-7R por Notch1 en el desarrollo de los linfocitos T en el timo humano.

Diferentes estudios han señalado la implicación de la señalización a través de las vías de Notch1 y del IL-7R en el desarrollo temprano de los linfocitos T, tanto en humanos (García-Peydró *et al.*, 2006) como en ratón (Balciunaite *et al.*, 2005). En este trabajo hemos identificado las bases moleculares de la relación funcional entre ambas vías. En primer lugar hemos demostrado que el gen que codifica para la cadena  $\alpha$  del IL-7R (*IL7R*) es una diana transcripcional de la vía de señalización de Notch1 en el linaje T. Teniendo en cuenta que los progenitores intratímicos expresan la cadena  $\gamma_c$  del IL-7R, el control que Notch1 ejerce sobre la expresión de IL-7R $\alpha$  es crítico para regular la expresión de un IL-7R funcional y, consecuentemente, la expansión temprana de la población de progenitores T en respuesta a la IL-7 producida en el microambiente tímico. Por tanto, este trabajo aporta la identificación de un nuevo mecanismo dependiente de la vía de Notch1, esencial para el proceso de diferenciación T en el timo humano. Esta nueva función de Notch1, junto con las funciones previamente descritas, que incluyen la especificación del linaje T, el bloqueo de la generación de linajes no-T y la inducción del proceso de selección  $\beta$ , aporta una información crucial para comprender de forma integrada el papel fundamental de la vía de Notch1 en el desarrollo de los linfocitos T.

Nuestros resultados demuestran que la forma activa de Notch1, ICN1, se une específicamente al promotor del gen *IL7R* a través del complejo CSL/MAML1. Este hallazgo proporciona la evidencia molecular de la existencia de un mecanismo de regulación diferencial de la expresión del *IL7R* en células del linaje T y B. Al mismo tiempo, ofrece la explicación molecular de la regulación dinámica de la expresión del IL-7R que tiene lugar durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo.

Durante la diferenciación de las células B en el hígado fetal y en la médula ósea del ratón, la expresión del gen *Il7ra* está regulada por dos factores de transcripción de la familia Ets, PU.1 y GABP $\alpha$ , que funcionan de manera secuencial a medida que avanza el proceso de maduración. PU.1 controla la expresión temprana del IL-7R en los progenitores de las células B a través de su unión a un sitio específico en el promotor de *Il7ra* (DeKoter *et al.*, 2002). Durante la maduración de las células B, GABP $\alpha$  reemplaza a PU.1, ocupando el mismo sitio de unión en el promotor de *Il7ra* y convirtiéndose en el regulador principal de su transcripción (DeKoter *et al.*, 2007). PU.1 también se expresa en los progenitores más inmaduros que colonizan el

timo procedentes de la médula ósea, pero esta expresión disminuye drásticamente después de la entrada al timo y desaparece en células pre-T, paralelamente a la activación de Notch1 (Anderson *et al.*, 1999 y este trabajo). La disminución de la expresión de PU.1 es necesaria para la especificación y progresión hacia el linaje T, ya que la expresión constitutiva de PU.1 bloquea el desarrollo T en el estadio temprano pro-T, lo que ha sugerido un papel inhibidor de Notch sobre la expresión de PU.1 (Anderson *et al.*, 2002). Es posible, por tanto, que la expresión de IL-7R $\alpha$  en los progenitores más tempranos que llegan al timo esté inducida pretímicamente por PU.1, pero que tras la especificación del linaje T en el timo, Notch1 reemplace a PU.1 en esta función. Alternativamente, la transactivación del *IL7R* podría ser inducida *de novo* intratímicamente tras la especificación del linaje T dependiente de Notch1, ya que los progenitores más inmaduros que llegan al timo carecen de la expresión de IL-7R $\alpha$  (García-Peydró *et al.*, 2006; Sambandam *et al.*, 2005). Conforme a esta última posibilidad, hemos demostrado que la activación de Notch1 induce la expresión de IL-7R $\alpha$  en células madre hematopoyéticas de cordón umbilical, que carecen de la expresión de este receptor.

No obstante, otros factores diferentes a Notch1 deben controlar la expresión de IL-7R $\alpha$  en células T maduras, ya que la señal de Notch1 declina drásticamente en el timo tras la selección  $\beta$ . Se ha descrito que GABP $\alpha$  regula la expresión de *Il7ra* en timocitos maduros de ratón (Xue *et al.*, 2004), siendo además necesario para la transición al estadio DP (Yu *et al.*, 2010). En nuestro estudio, los timocitos humanos en los estadios pre-TCR y DP, en los que los niveles de activación de Notch1 son bajos, muestran una expresión elevada de GABP $\alpha$ , lo que sugiere que GABP $\alpha$  debe controlar la transcripción de *IL7R* en células T maduras también en humanos. De este modo, GABP $\alpha$  podría actuar en concordancia con otros reguladores específicos del linaje T para inducir la expresión del IL-7R en momentos tardíos del desarrollo T humano, como ocurre durante la linfopoyesis B en ratón.

Recientemente se ha descrito que, tanto en precursores intratímicos, como en líneas T-ALL, la activación de la vía de Notch1 a través de su ligando DL4 induce una disminución en la proporción de islas CpG metiladas en el promotor del *IL7R* (Magri *et al.*, 2009), lo que en diversos promotores se asocia con la activación transcripcional (revisión en Jaenisch y Bird, 2003). En el caso de la vía canónica de señalización de Notch1, en ausencia de activación, CSL se encuentra formando un complejo con correpresores de la transcripción, entre los que se encuentran acetilasas y metilasas de histonas, como son SHARP/MINT/SPEN y NcoR/SMRT (revisión en Kopan e Ilagan,

2009). Tras la activación, estos correpresores son reemplazados por un complejo de activación transcripcional reclutado por ICN1, que incluye deacetilasas como SMRT/HDAC-1 (Kao *et al.*, 1998) y SHARP (Oswald *et al.*, 2002) y demetilases como KDM5A (Liefke *et al.*, 2010). Por tanto, el promotor del *IL7R* debe pasar de un estado inactivo, con mayor proporción de islas CpG metiladas en ausencia de ICN1, a un estado transcripcionalmente activo tras la activación de Notch1, que implica la pérdida de metilación y el reclutamiento de coactivadores.

En relación a las implicaciones funcionales de la regulación del IL-7R dependiente de Notch1, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la inhibición de Notch1 provoca un defecto en la proliferación de los progenitores del timo, que puede ser compensado por la sobreexpresión de IL-7R $\alpha$ . Por tanto, una vez se ha asegurado la especificación del linaje T, en parte mediante la inhibición de linajes alternativos, la función de Notch1 parece restringirse a la inducción de la expansión de la población de progenitores intratímicos dependiente de IL-7. Sin embargo, sólo los progenitores DN previos al proceso de selección  $\beta$  pueden ser rescatados por el IL-7R, lo que confirma que la selección  $\beta$  induce la supervivencia y la expansión de los timocitos pre-T de forma dependiente de Notch1 y del pre-TCR (Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2005; Taghon *et al.*, 2009), pero independiente del IL-7R. Por lo tanto, como se ha descrito en ratón (Di Santo *et al.*, 1999), los dos momentos cruciales de expansión de los linfocitos T en el timo son controlados de manera independiente por las funciones del IL-7R y del pre-TCR, pero ambos procesos son dependientes de la señalización por la vía de Notch1, lo que atribuye a Notch1 una función esencialmente inductora de proliferación.

Queda aún por demostrar la implicación de Notch1 en la inducción de reordenamientos en el *locus* TCR $\beta$ . Se ha descrito que los ratones deficientes en Notch1 acumulan en el timo una población de timocitos aberrantes en el estadio DN4, que no expresan la cadena TCR $\beta$  (Wolfer *et al.*, 2002). Dicha población es equivalente a la población de células DP CD3<sup>-</sup> TCR $\beta$ ic<sup>-</sup> que se acumula en nuestros cultivos de lóbulos tímicos reconstituidos con progenitores ETPs en los que bloqueamos la vía de Notch1. Aunque estos datos sugieren un posible papel activo de Notch1 en la inducción de una molécula TCR $\beta$  funcional, el defecto descrito en los timos deficientes en Notch1 no se rescata por la expresión de un transgén TCR $\beta$  o TCR $\alpha\beta$  (Maillard *et al.*, 2006), lo que confirma una función independiente de Notch1 y TCR $\beta$  en el proceso de selección  $\beta$ . Colectivamente, los resultados de este estudio han permitido identificar una nueva función de Notch1 como regulador de la

expansión de los progenitores T intratímicos en respuesta a IL-7 en los estadios madurativos previos a la adquisición del pre-TCR y al proceso de selección  $\beta$ .

Nuestros análisis de expresión génica muestran una regulación coordinada de la actividad de Notch1 y la expresión del IL-7R durante el desarrollo en el timo humano, que parece estar conservada en ratón (Anderson *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005). El patrón de expresión observado explica la dependencia de IL-7 específica del estadio madurativo DN. Así, el *IL7R* y los genes diana de Notch1 alcanzan su máxima expresión simultáneamente en los estadios DN2 y DN3 y ambos disminuyen antes de la transición al estadio DP. En concordancia con estos datos, la expansión masiva intratímica en respuesta a IL-7 ocurre en los estadios DN2 y DN3 (Peschon *et al.*, 1994; Shortman *et al.*, 1990; Sudo *et al.*, 1993), mientras que los timocitos se vuelven insensibles a la IL-7 en la transición desde la selección  $\beta$  hasta la selección positiva (Van de Wiele *et al.*, 1994), donde el proceso expansivo/selectivo es independiente de IL-7 y dependiente de la expresión de los receptores pre-TCR y TCR, respectivamente. Aunque en esta transición se detectan niveles bajos de expresión del IL-7R que podrían ser funcionales, hay que mencionar que la señalización a través del IL-7R, y de otros receptores de citoquinas, no sólo se regula a nivel transcripcional, sino que existen mecanismos de regulación negativa por miembros de la familia SOCS que aseguran la finalización de la señal inducida por IL-7, lo que constituye un suceso necesario para la progresión al estadio DP (Yu *et al.*, 2004). Posteriormente, tras el proceso de selección positiva, las señales inducidas a través del TCR reprimen la expresión de SOCS1 y restauran la expresión y señalización a través del IL-7R en timocitos maduros (Yu *et al.*, 2006). Este estricto control de la función del IL-7R es necesario para evitar la proliferación y supervivencia de los timocitos DP que no van a ser seleccionados, así como para escapar de la sobreactivación de un receptor de proliferación que podría contribuir a la transformación maligna de los timocitos (Laouar *et al.*, 2004).

La regulación dinámica del IL-7R determina asimismo una respuesta efectiva frente a la cantidad limitante de IL-7 producida en el microambiente tímico. La IL-7 es producida en el timo adulto de ratón por las TECs situadas en la región cortico-medular (CMJ; del inglés, *Cortico Medullar Junction*) y en la médula tímica (Alves *et al.*, 2009; Zamisch *et al.*, 2005). Esta producción local de IL-7 facilita la disponibilidad de cantidades suficientes de IL-7 a los progenitores inmigrantes de la médula ósea, que entran al timo a través de los vasos sanguíneos localizados en la CMJ. Así, el encuentro con un microambiente rico en factores de crecimiento, como la IL-7, favorece la enorme expansión de la población de progenitores que tiene lugar

en las primeras etapas de la diferenciación intratímica. Posteriormente, los progenitores intratímicos migran hacia las zonas externas del córtex, proceso guiado en parte por diferentes quimiocinas, como CXCR4, CCR7 y CCR9 (Benz *et al.*, 2004; Misslitz *et al.*, 2004; Plotkin *et al.*, 2003), donde tiene lugar la selección  $\beta$ . En esta localización las TECs muestran una baja producción de IL-7 (Zamisch *et al.*, 2005), y los timocitos adquieren la expresión del pre-TCR, cuyas señales de proliferación y supervivencia sustituyen a las del IL-7R, por lo que no son necesarias concentraciones elevadas de IL-7. Posteriormente, tras la expresión del TCR $\alpha\beta$ , los timocitos DP serán seleccionados en la corteza tímica y darán lugar a timocitos SP, que migran hacia la médula del timo, donde recuperan la expresión del IL-7R, responden a las altas concentraciones de IL-7 producidas por las TECs medulares (Alves *et al.*, 2009; Zamisch *et al.*, 2005) que favorecen su supervivencia, y se dirigen hacia los vasos sanguíneos de la CMJ, para emigrar del timo y poblar los órganos linfoides periféricos. Esta regulación temporal de la expresión del IL-7R debe ser, por tanto, dependiente del nicho intratímico en el que se localizan los progenitores en diferentes estadios madurativos, y podría estar controlada por la expresión diferencial de los distintos ligandos de Notch en localizaciones intratímicas particulares (Felli *et al.*, 1999; Parreira *et al.*, 2003 y nuestros resultados sin publicar).

En resumen, nuestros resultados indican que la vía de señalización de Notch1 desempeña una función fundamental regulando la expresión de IL-7R $\alpha$  específica de linaje y de estadio madurativo durante el desarrollo intratímico humano. De este modo, se optimiza la respuesta frente a la producción limitada de IL-7 en el timo, que finalmente resultará en la expansión de los progenitores que han iniciado el programa de maduración de los linfocitos T.

## 2. Implicación de la expresión y función del IL-7R en la fisiopatología de las T-ALLs.

En este trabajo hemos analizado, en segundo lugar, la relevancia patológica que puede tener la regulación transcripcional del IL-7R por Notch1 en el desarrollo intratímico, y demostramos que *IL7R* es también una diana transcripcional de Notch1 en T-ALLs, donde la expresión del IL-7R contribuye a la supervivencia y proliferación de las células leucémicas.

En humanos, el papel crítico que Notch1 desempeña en la generación de este tipo de leucemias se puso de manifiesto al descubrirse que más de un 60% de las T-ALLs poseían mutaciones somáticas en el gen *NOTCH1* (Mansour *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2004). La vía de Notch1 parece actuar concertadamente con otras vías de señalización en el mantenimiento de la capacidad oncogénica de las células T-ALL. Entre ellas se encuentran las vías de NF- $\kappa$ B, PI3K o c-myc. Se ha descrito que la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B en T-ALLs dependientes de Notch1 es suficiente para restringir su crecimiento tumoral (Vilimas *et al.*, 2007). Igualmente ocurre con c-myc, una diana transcripcional de la vía de Notch1, cuya expresión es necesaria para el desarrollo oncogénico de las células T dependiente de Notch1 (Li *et al.*, 2008). Nuestros resultados indican que la vía del IL-7R también coopera con Notch1 en el mantenimiento de las T-ALLs. Así, el efecto antitumoral de la inhibición de Notch por GSI puede ser contrarrestado por la activación de la vía IL-7/IL-7R, lo que sugiere que el potencial oncogénico de la activación constitutiva de Notch1 se debe, en parte, a una señalización desregulada a través del IL-7R. En efecto, nuestros resultados ponen de manifiesto un papel crítico del IL-7R en el mantenimiento de las leucemias T-ALL *in vitro*, y más importante, en su progresión tumoral *in vivo*. Estos resultados son de gran importancia ya que abren una nueva puerta para el diseño de estrategias terapéuticas frente a este tipo de leucemias centradas en la vía IL-7/IL-7R.

Se ha descrito que la señalización inducida por el IL-7R contribuye a la proliferación de las T-ALLs a través de la activación de PI3K, actuando a varios niveles: 1) promoviendo supervivencia mediante el incremento de los niveles de Bcl2, 2) induciendo la progresión del ciclo celular, por degradación de p27 e hiperfosforilación de Rb y 3) aumentando el metabolismo de la glucosa, tras la inducción de la expresión del transportador Glut1 (Barata *et al.*, 2004). Tanto los resultados del grupo de Barata, como los presentados en esta memoria, demuestran que la inhibición farmacológica de la actividad PI3K determina la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis. La relevancia de PI3K en la fisiopatología de la T-ALL se ha corroborado en leucemias primarias, donde se ha descrito que aproximadamente un 85% de los pacientes de T-ALL poseen una activación aberrante de esta vía en el momento del diagnóstico. Son diversos los mecanismos que provocan esta activación constitutiva, como mutaciones que afectan a PI3K, AKT o PTEN; fosforilación y oxidación de PTEN o supresión de la transcripción de PTEN mediada por Notch1 (Silva *et al.*, 2008). Varios inhibidores químicos de PI3K se han utilizado en ensayos preclínicos, no sólo en T-ALLs, sino también en otro tipo de

cánceres. Un ejemplo es el inhibidor de PI3K y mTOR, NVP-BEZ235, un derivado de una imidazoquinolina, disponible de forma oral, que ha entrado en ensayos clínicos debido a su gran toxicidad sobre T-ALLs y reducido efecto sobre células T CD4<sup>+</sup> de donantes sanos (Chiarini *et al.*, 2010).

Además de PI3K, nuestros resultados demuestran la activación constitutiva de la vía de ERK en las T-ALLs y sugieren que ésta es la vía principal responsable de la proliferación mediada por el IL-7R en este tipo de leucemia, ya que tras el silenciamiento de IL-7R $\alpha$ , es la vía de ERK, pero no la de PI3K, la que se ve comprometida. La activación de ERK inducida por el IL-7R parece ser dependiente del tipo celular (Barata *et al.*, 2004; Crawley *et al.*, 1996). Nuestros resultados muestran que la fosforilación de ERK se induce en respuesta a IL-7 en timocitos humanos en el estadio DN2, como había sido descrito para linfocitos T periféricos (Geginat *et al.*, 2003). El mecanismo molecular que determina la inducción de la vía de ERK en respuesta a IL-7 es aún desconocido. La vía de señalización Ras/MAPK/ERK ha centrado el interés de numerosos grupos para el diseño de inhibidores específicos (revisión en Montagut y Settleman, 2009), ya que la desregulación de Ras es común en numerosos tipos de cáncer, incluyendo las T-ALLs (Chiang *et al.*, 2008 y discusión más abajo), por lo que el uso de dichos inhibidores podría trasladarse al tratamiento de T-ALLs dependientes del IL-7R.

En un intento por identificar el mecanismo responsable de la activación constitutiva de ERK dependiente del IL-7R en T-ALLs, realizamos estudios de secuenciación encaminados a buscar mutaciones en *IL7R* que pudieran explicar la activación autónoma del IL-7R. En los ensayos de secuenciación de las líneas T-ALLs no hayamos mutaciones que pudiesen afectar a la señalización del IL-7R. Sin embargo, encontramos un alto número de polimorfismos o SNPs en *IL7R*. Los SNPs son mutaciones de un nucleótido en la secuencia de ADN, tanto intragénica como intergénica, que pueden afectar tanto a la regulación de la expresión de la proteína como a su función. Muchos de los SNPs que se encuentran establecidos en las poblaciones no poseen función deletérea, es decir, no provocan una función aberrante de la proteína que pueda ser letal para el individuo, de ahí su establecimiento en los genomas de la población. Sin embargo, gracias a estudios de genética de poblaciones se ha podido establecer un nexo entre la presencia de ciertos SNPs y la prevalencia o riesgo a padecer ciertas enfermedades.

Diversos estudios poblacionales han mostrado una mayor probabilidad de desarrollar esclerosis múltiple en individuos que poseen ciertos polimorfismos en *IL7R*. Uno de estos SNPs es el correspondiente a la posición 820pb de la secuencia del



ADNc, que implica un cambio de citosina por timina, provocando un cambio de aminoácido. Este SNP afecta a una secuencia de “*splicing*” alternativo, generándose una proteína IL-7R $\alpha$  que carece de la porción transmembrana y que se libera de forma soluble al medio extracelular, afectando al balance entre el receptor anclado a la membrana y el receptor soluble. Este efecto podría explicar la reducción de la función y expresión de IL-7R $\alpha$  en células T observada en pacientes con esclerosis múltiple. Dicho desequilibrio puede afectar a la función de las células T, tanto favoreciendo la respuesta antigénica hacia la proteína de mielina, como reduciendo la respuesta frente a infecciones víricas o bacterianas.

En el caso de las leucemias linfoblásticas agudas, el análisis de *IL7R* en pacientes diagnosticados de B- o T-ALL ha mostrado la presencia de tres isoformas de “*splicing*” alternativo, que determinan la generación de receptores truncados (Korte *et al.*, 2000). Una de ellas corresponde a la isoforma soluble que carece del dominio transmembrana; las otras dos isoformas codifican para proteínas transmembrana, que mantienen la porción proximal a la membrana del dominio intracelular (implicado preferentemente en la inducción de proliferación), pero que carecen del dominio distal (implicado principalmente en la transmisión de señales de diferenciación). La expresión de estas isoformas podría generar un predominio de señales mitogénicas, afectando a la expansión leucémica de un clon de células malignas y contribuir a la patogénesis de las ALL.

En nuestro estudio, hemos analizado la función que los SNPs hallados en las T-ALLs puedan desempeñar en el mantenimiento o generación de las T-ALLs. Hemos realizado diversas aproximaciones, comparando el efecto de la cadena IL-7R $\alpha$  que posee los SNPs con una cadena IL-7R $\alpha$  sin dichas variantes. Ninguno de los ensayos realizados nos ha permitido hallar un papel diferencial de los SNPs en la inducción de proliferación mediada por IL-7. No obstante, no podemos descartar que dichos SNPs confieran una ventaja proliferativa a las células T que los expresan *in vivo*, que en nuestro sistema experimental quedaría enmascarada por el exceso de IL-7 con el que se suplementan los cultivos. Tampoco podemos descartar que éstos u otros SNPs puedan tener un papel importante en la patogénesis de las T-ALLs o se relacionen con la susceptibilidad a padecer este tipo de cáncer. Por tanto, se requiere un trabajo más extenso, utilizando aproximaciones alternativas y estudios de genética de poblaciones, para poder descartar la implicación de los SNPs de *IL7R* en una función aberrante del IL-7R y en la patogénesis de las T-ALLs.



Como alternativa a la activación constitutiva del IL-7R, pensamos en la posible producción autocrina de IL-7 y/o TSLP por las T-ALLs que pudiera explicar la dependencia del IL-7R de las células tumorales. Esta hipótesis también fue descartada al no detectar transcritos de ARNm para dichas citoquinas en las líneas T-ALL. Finalmente, un tercer mecanismo compatible con el requerimiento del IL-7R para la proliferación y expansión tumoral *in vivo* de las T-ALLs estaría basado en la homodimerización constitutiva de la subunidad IL-7R $\alpha$  o la heterodimerización IL-7R $\alpha$ / $\gamma$ c independiente de la presencia de IL-7. La homodimerización de receptores heterodiméricos para factores de crecimiento se ha descrito previamente. En el caso del receptor de IL-9, compuesto por la subunidad  $\gamma$ c y una subunidad específica IL-9R $\alpha$ , las cadenas IL-9R $\alpha$  son capaces de homodimerizar y favorecer la activación de la vía JAK/STAT en ausencia de IL-9 (Hornakova *et al.*, 2009). Un mecanismo similar se ha descrito para el receptor de eritropoyetina (EPO) (Constantinescu *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible que algunos de los SNPs hallados en las T-ALLs, especialmente aquellos situados en la región transmembrana, confieran a la cadena IL-7R $\alpha$  una capacidad de homodimerización anormal que conlleve a una activación constitutiva de sus vías de señalización, confiriendo cierta ventaja en crecimiento a las células leucémicas. Sin embargo este aspecto no ha sido analizado en nuestro estudio.

Se han descrito mutaciones en las quinasas JAKs en diferentes tipos de cáncer. Un ejemplo son las mutaciones en JAK2 halladas en leucemias mieloides (revisión en Levine *et al.*, 2007), que confieren actividad constitutiva a la quinasa. En T-ALLs se ha descrito la presencia de mutaciones en JAK1 en un 18% de las muestras analizadas (Flex *et al.*, 2008), que igualmente confieren una capacidad de señalización constitutiva. El análisis mutacional de la vía JAK/STAT en líneas celulares T-ALL demostró que únicamente la línea HPB-ALL posee una mutación puntual en JAK1, pero dicha mutación no induce una mayor activación de la vía (Porcu *et al.*, 2009). Además estudios de secuenciación realizados en colaboración con el Dr. Ferrando (Columbia University) no reportaron la presencia de mutaciones activadoras en JAKs (1, 2 y 3) en las T-ALLs empleadas en este estudio. Por otra parte, nuestros ensayos de *Western Blot* sugieren que la vía JAK/STAT no se encuentra activa constitutivamente en la mayoría de las T-ALLs analizadas. Aunque cabe la posibilidad de que la vía JAK/STAT5 se halle activa a unos niveles que no hemos podido detectar, nuestros resultados favorecen la idea de que la funcionalidad del IL-7R descrita en este estudio es independiente de la existencia de mutaciones en

JAK y de la activación constitutiva de la vía JAK/STAT, y señalan a la vía Ras/MAPK/ERK como la principal implicada en el proceso.

No obstante, como ya hemos mencionado, nuestros estudios funcionales sugieren que la activación constitutiva de ERK mediada por el IL-7R expresado en T-ALLs, no es suficiente para conferir una ventaja proliferativa a los mismos. Aunque ya hemos discutido que esta función podría estar enmascarada en nuestros ensayos por la suplementación exógena de IL-7, es necesario mencionar que tampoco la sobreexpresión de ICN1 es suficiente para inducir una ventaja de crecimiento independiente de IL-7 en timocitos primarios *in vitro* (García-Peydró et al., 2006). Además, a diferencia de lo reportado en ratón (Aster *et al.*, 2000), la sobreexpresión de ICN1 en HSCs humanas no es suficiente para la inducción de T-ALL *in vivo* (García-Peydró *et al.*, en preparación). En este contexto, hay que destacar que las mutaciones activadoras en el dominio HD de *NOTCH1* halladas en pacientes con T-ALL son incapaces de generar por sí solas leucemias T en ratones (Chiang *et al.*, 2008), lo que se relaciona con una menor capacidad de señalización que la descrita para ICN1. Sin embargo, estos mutantes de Notch1 cooperan con mutaciones activadoras en la vía de Ras, como K-ras<sup>G12D</sup>, en la generación de T-ALLs, acelerando el proceso oncogénico y contribuyendo a la transformación celular (Chiang *et al.*, 2008). La cooperación entre las vías de Ras/MAPK/ERK y Notch se ha descrito para otro tipo de cánceres, como el cáncer de mama (Mittal *et al.*, 2009). Por tanto, es posible que la activación constitutiva de MAPK/ERK descrita en este estudio en las T-ALLs dependientes de Notch1 que expresan el IL-7R, coopere con Notch1 en el mantenimiento de su potencial oncogénico. En este escenario, la contribución de ambas vías, Notch1 e IL-7R, al desarrollo de las leucemias T-ALL demanda estudios *in vivo*, utilizando HSCs humanas modificadas transferidas a ratones inmunodeficientes, que se encuentran en marcha en la actualidad en nuestro laboratorio.

### 3. Inducción del procesamiento de Notch1 por la activación de ADAMs dependiente de ERK inducida vía IL-7R.

La cooperación de las vías de ERK e ICN1 queda demostrada en nuestro estudio por experimentos que indican, no sólo la regulación transcripcional del IL-7R por Notch1, sino la existencia de una regulación recíproca de la activación de Notch1 por el IL-7R, lo que constituye un nexo adicional entre ambas vías. Este mecanismo de regulación positiva de Notch1 implica la activación de metaloproteasas de la

familia ADAM, encargadas del procesamiento de ICN1, que estaría mediada por ERK (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003). Por tanto, la activación constitutiva de ERK dependiente del IL-7R en las T-ALLs sería determinante para mantener la activación sostenida de Notch1, que a su vez mantendría la expresión del IL-7R por un mecanismo de retroalimentación positiva crítico para el proceso oncogénico.

Dos miembros de la familia ADAM se han implicado preferentemente en el corte proteolítico de Notch, ADAM10 y ADAM17. Se ha demostrado que ADAM10 es necesaria para la señalización inducida por Notch durante el desarrollo de las células T, ya que ratones deficientes en esta proteína muestran un bloqueo en la diferenciación T similar al que ocurre en ratones Notch1<sup>(-/-)</sup> (Tian *et al.*, 2008). Un estudio comparativo de la capacidad de procesamiento de Notch1 por ambas metaloproteasas concluyó que, en un contexto dependiente de ligando, ADAM10 sería la principal metaloproteasa implicada en el corte proteolítico de Notch1, mientras que ADAM17 lo sería en ausencia de ligando, como ocurre en muchas T-ALLs que poseen mutaciones en el dominio HD de Notch1. Es por tanto factible que ADAM17 sea la metaloproteasa implicada en el procesamiento de Notch1 dependiente de ERK y el IL-7R en nuestras muestras de T-ALLs.

Nuestros datos indican que ICN1 es procesado constitutivamente por ADAM en T-ALLs, aunque el procesamiento de Notch1 aumenta tras la estimulación con IL-7. Paralelamente hemos detectado un aumento en la actividad ADAM dependiente de ERK en respuesta a IL-7. Varios grupos han descrito que ERK1/2 fosforila la Tirosina735 (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002) o la Serina819 (Fan *et al.*, 2003) del dominio intracelular de ADAM17. Esta fosforilación incrementa la actividad catalítica de ADAM17 sobre sus sustratos. Aunque estudios posteriores han demostrado que la mutación de la Tirosina735 o la ablación del dominio intracitoplásmico de ADAM17 no afecta a su actividad (Doedens *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2000), es posible que la fosforilación mediada por ERK1/2 constituya un mecanismo no exclusivo de activación de ADAM17 que incrementa su actividad.

Son varios los estímulos que se han descrito capaces de inducir fosforilación y activación de ADAM17, como los ésteres de forbol (PMA), o la estimulación inducida por la unión de un factor de crecimiento a su receptor, lo que concuerda con el mecanismo propuesto en este trabajo. Entre los factores de crecimiento responsables de la activación de ADAM17 se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), nervioso (NGF) y de fibroblastos (FGF) (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003) y se ha descrito la regulación negativa de ADAM17 por la IL-10 (Brennan *et al.*, 2008). Por tanto, la regulación de ADAM17 por factores de crecimiento parece ser un

mecanismo general de regulación que sería extensible a la IL-7, aunque nuestros ensayos no nos permiten descartar la implicación de ADAM10 en el procesamiento de Notch1 inducido vía IL-7R. Considerando la función de ADAM10 en el desarrollo intratímico (Tian *et al.*, 2008) es también posible que esta metaloproteasa sea la responsable del procesamiento basal de Notch1 y que, en situaciones de estimulación a través del IL-7R, se induzca la activación de ADAM17, y por tanto se incremente ICN1 sobre los niveles basales. Este mecanismo podría ocurrir diferencialmente en condiciones fisiológicas o patológicas. Sería factible que durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo, ADAM10 fuera la proteasa principal implicada en el procesamiento de Notch1, mientras que tras la transformación maligna que ocurre en leucemias, se indujese la actividad ADAM17 en respuesta a factores de crecimiento, como mecanismo para favorecer la señalización de Notch1 y el desarrollo tumoral.

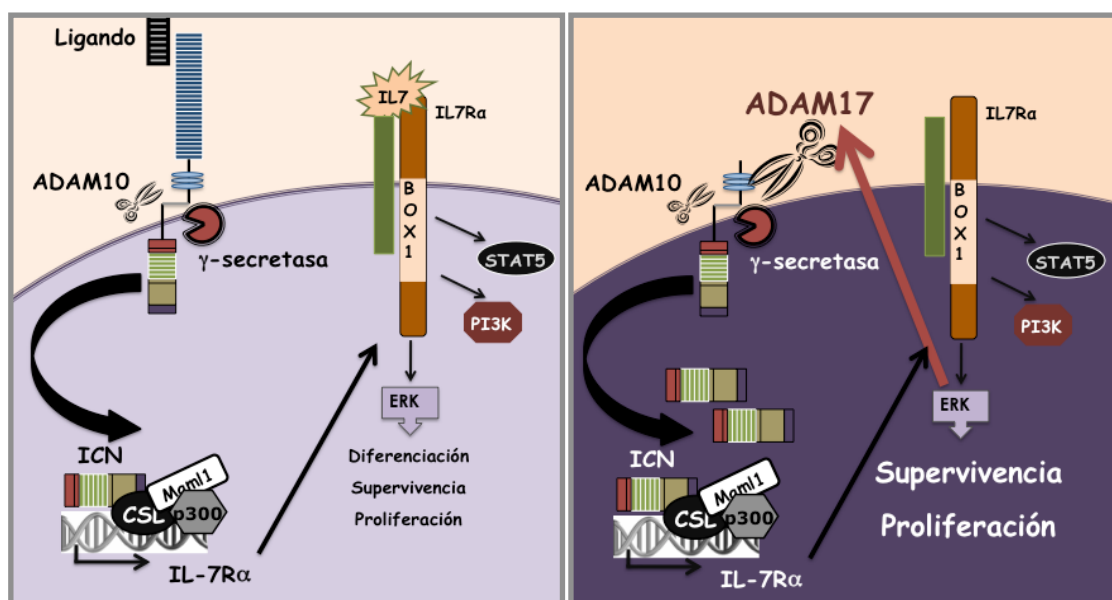
Tanto la regulación de la activación de ADAM17 como la de otros miembros de la misma familia, cobra creciente importancia debido a su participación en numerosos procesos celulares, como son la adhesión, migración y fusión celulares y la liberación de sustratos desde la superficie celular, entre los que se incluyen TNF- $\alpha$ , TGF $\alpha$ , TNFRI, II, NGFR, efrinas y cadherinas. Es más, se sabe que diversas ADAMs se sobreexpresan en tumores malignos (Murphy, 2008) y participan en la patología de los cánceres, facilitando la promoción del crecimiento celular y la invasión, gracias a su papel regulador de las actividades de diversos factores de crecimiento e integrinas.

Es importante, por tanto, profundizar en el estudio de la regulación específica dependiente del tipo celular de estas metaloproteasas, haciendo especial énfasis en las implicaciones sobre la activación de la vía de Notch1 en células tumorales. A este respecto, en colaboración con el grupo de la Dra. Bovolenta (CBMSO) hemos iniciado un estudio para abordar el papel de la proteína SFRP1 como inhibidor de ADAM10 (Esteve *et al.*, 2011) en células leucémicas dependientes de la vía de Notch1.

#### **4. Modelo propuesto de cooperación de las vías de Notch1 e IL-7R en desarrollo normal T y en leucemias T-ALL.**

En conjunto, nuestros resultados permiten proponer un modelo sobre el mecanismo de acción cooperativa de las vías de Notch1 y del IL-7R (**Figura 40**), que sería operativo, tanto durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T en el timo, como en el mantenimiento de las T-ALLs. Según este modelo, durante la

diferenciación en el timo, Notch1 interaccionaría con sus ligandos y, tras el procesamiento por ADAM10 y  $\gamma$ -secretasas, induciría la expresión de IL-7R $\alpha$  de manera estadio-específica a través de la regulación de su transcripción, permitiendo a los linfocitos T responder a la IL-7 producida localmente en el timo. Esta señalización vía IL-7R conllevaría la activación de las vías de señalización JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK, generando señales de supervivencia, proliferación y diferenciación. Entre ellas, la actividad quinasas de ERK1/2 favorecería la fosforilación del dominio intracelular de ADAM17. Dado que la activación inicial de Notch1 en el timo es dependiente de ligando, sería la disponibilidad de los mismos en un nicho intratímico concreto, la que controlaría la activación de la vía de Notch1.



**Figura 40.** Modelo hipotético de la relación existente entre las vías de Notch1 e IL-7R durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo (izqda.) o en células T leucémicas con mutaciones en *NOTCH1* que generan una activación de la vía independiente de la presencia de ligando (dcha.).

Sin embargo, en condiciones patológicas producidas por la activación constitutiva de la vía de Notch1, debido a mutaciones que confieran una capacidad de señalización independiente de ligando, la señalización mantenida vía IL-7R podría inducir un incremento de la actividad de ADAM17 a través de la activación de ERK1/2 que, junto con ADAM10, incrementarían el procesamiento de Notch1 independiente de ligando en las T-ALLs. A su vez, Notch1 regularía la expresión de IL-7R $\alpha$ , cerrando un circuito de retroalimentación positiva responsable de la actividad proto-oncogénica del IL-7R en T-ALLs. Por tanto, son varios los puntos de posible intervención terapéutica en esta situación patológica, entre los que se incluyen la

inhibición de  $\gamma$ -secretasas y ADAMs, el bloqueo de la vía del IL-7R y la inhibición de PI3K y ERK, generando numerosas posibilidades para el diseño de nuevas terapias frente a las T-ALLs.

## 5. Nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de las T-ALLs.

La supervivencia asociada a los tratamientos dirigidos frente a las T-ALLs ha experimentado un gran incremento en los últimos años, pero todavía la T-ALL continúa teniendo un mal pronóstico en aproximadamente el 50% de los casos en adultos. Por ello, en la actualidad, los esfuerzos se están centrando en el diseño de nuevas terapias que permitan mejorar la supervivencia de los pacientes de T-ALL.

La alta prevalencia de mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* presentes en T-ALLs ha promovido el inicio de ensayos clínicos encaminados a testar la efectividad del tratamiento con GSI en pacientes. Sin embargo, la eficacia de este fármaco se ha visto cuestionada por dos motivos principales. El primero de ellos, debido a su gran toxicidad gastrointestinal; el segundo, motivado por su reducida capacidad de inducción de apoptosis en líneas T-ALL humanas *in vitro* (Lewis *et al.*, 2007; Palomero *et al.*, 2007). A este respecto, se ha descrito recientemente que la resistencia a GSI que presentan ciertas T-ALLs *in vitro* se debe a un segundo evento mutacional en el gen *PTEN*, que provoca un defecto de la expresión del gen o la inactivación de la función de la proteína (Palomero *et al.*, 2007). La proteína PTEN es un regulador negativo de la vía PI3K, uno de los principales reguladores del metabolismo y proliferación celular en los linfocitos T. Se ha descrito que Notch1 reprime la transcripción de *PTEN*, a través del represor Hes1, favoreciendo la actividad de PI3K (Palomero *et al.*, 2007). La inhibición de Notch por el tratamiento con GSI facilitaría la transcripción de *PTEN*, con la consiguiente disminución de la actividad de PI3K. En el caso de que coexistan en la misma célula mutaciones activadoras de *NOTCH1* e inactivadoras de *PTEN*, como es el caso de ciertas T-ALLs, el tratamiento con GSI no sería suficientemente efectivo para inducir un bloqueo en la proliferación y/o una inducción de apoptosis, ya que no existiría regulación negativa sobre la vía PI3K y, por tanto, estas células continuarían proliferando en ausencia de Notch1. La vía PI3K es activada por el IL-7R, por lo que el IL-7R puede ser un candidato idóneo de intervención para bloquear la iniciación de la activación de la cascada PI3K/AKT en un contexto dependiente de Notch1. En consecuencia, el análisis exhaustivo del estado mutacional de las vías Notch1, IL-7R y PTEN/PI3K, es

crítico para la elección del abordaje terapéutico más adecuado en el tratamiento de las T-ALLs.

En cuanto a la alta toxicidad gastrointestinal detectada en pacientes tratados con GSI, los trabajos del grupo del Dr. Ferrando han contribuido significativamente al entendimiento del mecanismo por el cuál la inhibición de Notch1 causa estos efectos adversos (Real *et al.*, 2009). Notch1 regula negativamente la expresión de *Klf4* en el intestino a través del represor Hes1 (Real *et al.*, 2009). *Klf4* es un gen supresor de tumores que codifica para el factor de transcripción *Krüppel-like zinc finger 4*, requerido para la diferenciación de las células caliciformes en el intestino. Los ratones tratados con GSI muestran una acumulación de células caliciformes que sobreexpresan *Klf4*, generando la toxicidad intestinal. Esta toxicidad puede ser contrarrestada por el tratamiento conjunto con GSI y glucocorticoides, a la vez que se potencia el efecto citotóxico del GSI sobre las células leucémicas.

Considerando que los trabajos más recientes en el campo de la oncogénesis mediada por Notch se están centrando en el estudio de nuevas vías que puedan actuar cooperativamente con Notch, merece tenerse en consideración la vía del IL-7R para el desarrollo de nuevas combinaciones farmacológicas más dirigidas y con menores efectos adversos en el tratamiento de las T-ALLs, ya que nuestros resultados indican que la vía del IL-7R es crítica para la progresión tumoral de las T-ALLs. Un abordaje terapéutico podría ser el bloqueo de la vía del IL-7R. En nuestro trabajo hemos realizado este tipo de aproximaciones mediante el uso de vectores lentivirales que portan un ARN de interferencia frente al *IL7R*. Los resultados son prometedores, ya que la inhibición de la expresión de IL-7R $\alpha$  redujo la capacidad tumoral *in vivo* de las T-ALLs. En pacientes con T-ALL la inhibición de la señalización del IL-7R podría realizarse mediante anticuerpos bloqueantes, al igual que se realiza para otro tipo de receptores de factores de crecimiento, como es el caso del IL-2R en situaciones de rechazo a trasplantes, utilizando fármacos como el Basiliximab (revisión en Ramirez y Marino, 2007), o del EGFR, mediante el tratamiento con Cetuximab y Panitumumab, en el caso de cáncer colorrectal y el cáncer de cuello y cabeza (revisión en Markman *et al.*, 2009). El tratamiento de leucemias de origen B con este tipo de abordaje se realiza desde hace tiempo, como es el caso del Rituximab para el tratamiento de linfomas no-Hodgkin, basado en un anticuerpo monoclonal frente al antígeno CD20 expresado en los linfocitos B. En el caso del IL-7R se ha de tener en cuenta para este tipo de terapias que la proliferación homeostática de los linfocitos T periféricos depende en gran medida de la señalización a través del IL-7R (Schluns *et al.*, 2000). Tal es la importancia de esta vía en el mantenimiento de la población de linfocitos T

periféricos, que la administración de IL-7 se está usando actualmente en estudios preclínicos en pacientes con inmunodeficiencia adquirida por infección con VIH (SIDA; revisión en Capitini *et al.*, 2009). En estos pacientes, la administración de inyecciones subcutáneas de IL-7 favorece la expansión y la supervivencia de las células T periféricas *naïve* y memoria CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, lo que contribuye a la recuperación de la linfopenia característica de estos pacientes. En contrapartida, algunos estudios han revelado que la IL-7 también favorece la replicación del virus VIH, induciendo mutaciones más agresivas y facilitando su entrada en la célula a través del receptor de quimiocinas CXCR4 (revisión en Capitini *et al.*, 2009). Habría que considerar también la implicación de esta vía en otro tipo de enfermedades, como son la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide. Por tanto, son necesarios estudios en profundidad que permitan establecer el papel fisiológico de la vía IL7/IL-7R en diferentes patologías para poder diseñar estrategias terapéuticas eficientes dirigidas frente al IL-7R en T-ALLs, con el mínimo efecto secundario, y analizar su potencial en combinación con otros agentes quimioterapéuticos como pueden ser los inhibidores de Notch, con objeto de mejorar la supervivencia de los pacientes. Más importante, esta estrategia podría hacerse extensiva al tratamiento de las pre-B-ALLs, de mayor incidencia que las T-ALLs, cuya dependencia de la expresión del IL-7R mostrada en este estudio merece ser estudiada en profundidad, con el fin de identificar el mecanismo subyacente y su relación con las vías de señalización que participen en la oncogénesis de las leucemias ALL de origen B.



***CONCLUSIONES***  
CONCLUSIONES



- 1) El gen *IL7R* es una diana transcripcional directa de Notch1 en los progenitores hematopoyéticos y en los precursores de los linfocitos T humanos.
- 2) La regulación transcripcional de *IL7R* dependiente de Notch1 controla la expresión específica de linaje (T) y de estadio madurativo de IL-7R $\alpha$  por un mecanismo dependiente de la unión del complejo CSL/MAML1 a una secuencia consenso en su promotor.
- 3) La expresión ectópica de IL-7R $\alpha$  rescata el defecto en proliferación que provoca la ausencia de Notch1 en los estadios tempranos de la diferenciación de los linfocitos T humanos. Por tanto, Notch1 regula la expansión de los timocitos en desarrollo, en parte, a través de la regulación de la vía IL-7/IL-7R.
- 4) Notch1 regula la expresión de IL-7R $\alpha$  en leucemias T linfoblásticas agudas (T-ALLs).
- 5) La expresión de IL-7R $\alpha$  es indispensable para preservar la proliferación y supervivencia de ALLs T y B *in vitro* y para mantener su potencial oncogénico *in vivo* en ratones inmunodeficientes. Por tanto, el IL-7R es una posible diana terapéutica en ALLs.
- 6) Las T-ALLs que expresan el IL-7R muestran una activación constitutiva de las vías de señalización asociadas al IL-7R PI3K/AKT y MAPK/ERK. La activación constitutiva de MAPK/ERK pero no la de PI3K/AKT es dependiente de la expresión del IL-7R.
- 7) Las cadenas IL-7R $\alpha$  que expresan diferentes T-ALLs contienen distintos polimorfismos de un único nucleótido o SNPs, que han sido implicados en la susceptibilidad a distintas enfermedades.
- 8) La señalización vía IL-7R induce la activación de las metaloproteasas ADAM, en un mecanismo dependiente de la activación de la vía MAPK/ERK, lo que sugiere una regulación positiva cruzada entre Notch1 y el IL-7R responsable de la expansión y progresión tumoral de las T-ALLs.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

BIBLIOGRAFÍA



- Adler SH**, Chiffoleau E, Xu L, Dalton NM, Burg JM, Wells AD, Wolfe MS, Turka LA, Pear WS. (2003) Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol*, 171(6):2896-903.
- Adolfsson J**, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. (2005) Identification of Flt3<sup>+</sup> lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121(2):295-306.
- Aifantis I**, Raetz E, Buonamici S. (2008) Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*, 8(5):380-90.
- Akashi K**, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. (1997) Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell*, 89(7):1033-4.
- Akashi K**, Traver D, Zon LI. (2005) The complex cartography of stem cell commitment. *Cell*, 121(2):160-2.
- Allman D**, Karnell FG, Punt JA, Bakkour S, Xu L, Myung P, Koretzky GA, Pui JC, Aster JC, Pear WS. (2001) Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med*, 194(1):99-106.
- Allman D**, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A. (2003) Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*, 4(2):168-74.
- Alves NL**, Richard-Le Goff O, Huntington ND, Sousa AP, Ribeiro VS, Bordack A, Vives FL, Peduto L, Chidgey A, Cumano A, Boyd R, Eberl G, Di Santo JP. (2009) Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5):1512-7.
- Anderson MK**, Hernández-Hoyos G, Diamond RA, Rothenberg EV. (1999) Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development*, 126(14):3131-48.
- Anderson G**, Lane PJ, Jenkinson EJ. (2007). Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol*, 7(12):954-63.
- Anderson MK**, Weiss AH, Hernandez-Hoyos G, Dionne CJ, Rothenberg EV. (2002) Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity*, 16(2):285-96.
- Ardavin C**, Wu L, Li CL, Shortman K. (1993) Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*, 362(6422):761-3.
- Artavanis-Tsakonas S**, Rand MD, Lake RJ. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284: 770-6.
- Aster JC**, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC, Pear WS. (2000) Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol*, 20(20):7505-15.
- Balcunaite G**, Ceredig R, Fehling HJ, Zúñiga-Pflücker JC, Rolink AG. (2005) The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation. *Eur J Immunol*, 35(4):1292-300.
- Barata JT**, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA. (2004) Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*, 200(5):659-69.
- Barata JT**, Cardoso AA, Boussiotis VA. (2005) Interleukin-7 in T-cell acute lymphoblastic leukemia: an extrinsic factor supporting leukemogenesis? *Leuk Lymphoma*, 46(4):483-95.

- Bell JJ, Bhandoola A. (2008)** The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*, 452(7188):764-7.
- Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, Balestri A, Biondi A, Cazzaniga G, Lendahl U, Fehling HJ, Hayday AC, Frati L, von Boehmer H, Gulino A, Screpanti I. (2002)** Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6):3788-93.
- Benz C, Heinzel K, Bleul CC. (2004)** Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol*, 34(12):3652-63.
- Bertolino E, Reddy K, Medina KL, Parganas E, Ihle J, Singh H. (2005)** Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol*, 6(8):836-43.
- Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. (2007)** Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity*, 26(6): 678-89.
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. (1997)** Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, 90(2):281-91.
- Blom B, Spits H. (2006)** Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*, 24:287-320.
- Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, Bakker AQ, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ, Spits H. (1999)** TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood*, 93(9):3033-43.
- Bozkulak EC, Weinmaster G. (2009)** Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol*, 29(21):5679-95.
- Brennan FM, Green P, Amjadi P, Robertshaw HJ, Alvarez-Iglesias M, Takata M. (2008)** Interleukin-10 regulates TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. *Eur J Immunol*, 38(4):1106-17.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A. (2000)** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, 5(2):207-16.
- Bruckner K, Perez L, Clausen H, Cohen S. (2000)** Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature*, 406:411-415.
- Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. (2009)** Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies. *J Intern Med*, 266(2):141-53.
- Carrasco YR, Navarro MN, de Yébenes VG, Ramiro AR, Toribio ML. (2002)** Regulation of surface expression of the human pre-T cell receptor complex. *Semin Immunol*, 14(5):325-34.
- Carrasco YR, Trigueros C, Ramiro AR, de Yébenes VG, Toribio ML. (1999)** Beta-selection is associated with the onset of CD8beta chain expression on CD4(+)CD8alphaalpha(+) pre-T cells during human intrathymic development. *Blood*, 94(10):3491-8.
- Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, Morton LM, Davis S, Severson RK, Rothman N, Lynch CF, Wacholder S, Chanock SJ, Habermann TM, Hartge P. (2007)** Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood*, 109(12):5439-46.



- Chiang MY**, Xu L, Shestova O, Histen G, L'heureux S, Romany C, Childs ME, Gimotty PA, Aster JC, Pear WS. (2008) Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest*, 118(9):3181-94.
- Chiarini F**, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A, Battistelli M, Falcieri E, Melchionda F, Pession A, Pagliaro P, McCubrey JA, Martelli AM. (2010) Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 70(20):8097-107.
- Ciofani M**, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, Zúñiga-Pflücker JC. (2004) Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol*, 172(9):5230-9.
- Ciofani M**, Knowles GC, Wiest DL, von Boehmer H, Zúñiga-Pflücker JC. (2006) Stage-specific and differential notch dependency at the  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lineage bifurcation. *Immunity*, 25:105-116.
- Ciofani M**, Zúñiga-Pflücker JC. (2005) Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol*, 6(9):881-8.
- Ciofani M**, Zúñiga-Pflücker JC. (2007) The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:463-493.
- Constantinescu SN**, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. (2001) Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4379-84.
- Correale J**, Fiol M, Gilmore W. (2006) The risk of relapses in multiple sclerosis during systemic infections. *Neurology*, 67(4):652-9.
- Crawley JB**, Willcocks J, Foxwell BM. (1996) Interleukin-7 induces T cell proliferation in the absence of Erk/MAP kinase activity. *Eur J Immunol*, 26(11):2717-23.
- Deangelo DJ**, Stone RM, Silverman LB, Stock W, Attar EC, Fearen I, Dallob A, Matthews C, Stone J, Freedman SJ, Aster J. (2006). A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. *Journal of Clinical Oncology*, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 6585
- DeKoter RP**, Lee HJ, Singh H. (2002) PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*, 16(2):297-309.
- DeKoter RP**, Schweitzer BL, Kamath MB, Jones D, Tagoh H, Bonifer C, Hildeman DA, Huang KJ. (2007) Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells. *J Biol Chem*, 282(19):14194-204.
- De Smedt M**, Reynvoet K, Kerre T, Taghon T, Verhasselt B, Vandekerckhove B, Leclercq G, Plum J. (2002) Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J Immunol*, 169(6):3021-9.
- De Smedt M**, Hoebeke I, Reynvoet K, Leclercq G, Plum J. (2005) Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood*, 106(10):3498-506.
- De Strooper B**, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727):518-22.
- de Yébenes VG**, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML. (2002) Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 99(8):2948-56.

**Díaz-Rodríguez E**, Montero JC, Esparís-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*, 13(6):2031-44.

**Dibirdik I**, Langlie MC, Ledbetter JA, Tuel-Ahlgren L, Obuz V, Waddick KG, Gajl-Peczalska K, Schieven GL, Uckun FM. (1991) Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, 78(3):564-70.

**Di Santo JP**, Aifantis I, Rosmaraki E, Garcia C, Feinberg J, Fehling HJ, Fischer A, von Boehmer H, Rocha B. (1999) The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development. *J Exp Med*, 189(3):563-74.

**Doedens JR**, Mahimkar RM, Black RA. (2003) TACE/ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(2):331-8.

**Dong WF**, Xu Y, Hu QL, Munroe D, Minowada J, Housman DE, Minden MD. (1995) Molecular characterization of a chromosome translocation breakpoint t(11;14)(p13;q11) from the cell line KOPT-K1. *Leukemia*, 9(11):1812-7.

**Drexler HG**, Gaedicke G, Minowada J. (1985) Isoenzyme studies in human leukemia-lymphoma cell lines--1. Carboxylic esterase. *Leuk Res*, 9(2):209-29.

**D'Souza B**, Miyamoto A, Weinmaster G. (2008) The many facets of Notch ligands. *Oncogene*, 27(38):5148-67.

**DuBridge RB**, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, 7(1):379-87.

**Esteve P**, Sandonís A, Cardozo M, Malapeira J, Ibañez C, Crespo I, Marcos S, Gonzalez-Garcia S, Toribio ML, Arribas J, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P. (2011) SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci*, 14(5):562-9.

**Ellisen LW**, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4):649-61.

**Fan H**, Turck CW, Derynck R. (2003) Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem*, 278(20):18617-27.

**Felli MP**, Maroder M, Mitsiadis TA, Campese AF, Bellavia D, Vacca A, Mann RS, Frati L, Lendahl U, Gulino A, Screpanti I. (1999) Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol*, 11(7):1017-25.

**Fisher AG**, Larsson L, Goff LK, Restall DE, Happerfield L, Merckenschlager M. (1990) Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Int Immunol* 2, 571-578.

**Flex E**, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F, Martinelli S, Fragale A, Sanchez M, Tavolaro S, Messina M, Cazzaniga G, Camera A, Pizzolo G, Tornesello A, Vignetti M, Battistini A, Cavé H, Gelb BD, Renauld JC, Biondi A, Constantinescu SN, Foà R, Tartaglia M. (2008) Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, 205(4):751-8.

**Galy A**, Verma S, Bárcena A, Spits H. (1993) Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med*, 178(2):391-401.

**Garbe AI**, Krueger A, Gounari F, Zúñiga-Pflücker JC, von Boehmer H. (2006) Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines alphabeta versus gammadelta lineage fate. *J Exp Med*, 203(6):1579-90.

**García-Peydró M**, de Yébenes VG, Toribio ML. (2006) Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol*, 177(6):3711-20.

**García-Peydró M**, de Yébenes VG, Toribio ML. (2003) Sustained Notch1 signaling instructs the earliest human intrathymic precursors to adopt a gammadelta T-cell fate in fetal thymus organ culture. *Blood*, 102(7):2444-51.

**Geginat J**, Sallusto F, Lanzavecchia A. (2003) Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory and effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. *Pathol Biol (Paris)*, 51(2):64-6

**González-García S**, García-Peydró M, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, de la Pompa JL, Ferrando AA, Toribio ML. (2009) CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med*, 206(4):779-91. Erratum in: *J Exp Med*, 206(7):1633.

**Goodwin RG**, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, Park LS. (1990) Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*, 60(6):941-51.

**Gregory SG**, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL; Multiple Sclerosis Genetics Group. (2007) Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*, 39(9):1083-91.

**Hacein-Bey-Abina S**, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*, 118(9):3132-42.

**Hacein-Bey-Abina S**, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302(5644):415-9. Erratum in: *Science*. 2003, 302(5645):568.

**Heinzel K**, Benz C, Martins VC, Haidl ID, Bleul CC. (2007) Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *J Immunol*, 178(2):858-68.

**Henriques CM**, Rino J, Nibbs RJ, Graham GJ, Barata JT. (2010) IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R $\alpha$  in T cells. *Blood*, 115(16):3269-77.

**Heron M**, Grutters JC, van Moorsel CH, Ruven HJ, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH, Claessen AM, van den Bosch JM. (2009) Variation in IL7R predisposes to sarcoid inflammation. *Genes Immun*, 10(7):647-53.

**Hoffman E**, Passoni L, Crompton T, Leu T, Schatz D, Koff A, Owen MJ, Hayday AC. (1996) Productive T cell receptor  $\beta$  chain gene rearrangement: close interplay of cell cycle and cell differentiation during T cell development *in vivo*. *Genes Dev*, 10: 948-62.

**Hornakova T, Staerk J, Royer Y, Flex E, Tartaglia M, Constantinescu SN, Knoops L, Renauld JC. (2009)** Acute lymphoblastic leukemia-associated JAK1 mutants activate the Janus kinase/STAT pathway via interleukin-9 receptor alpha homodimers. *J Biol Chem*, 284(11):6773-81.

**Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, Gilmour KC, Adams S, Thornhill SI, Parsley KL, Staal FJ, Gale RE, Linch DC, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb DK, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar HB, Thrasher AJ. (2008)** Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*, 118(9):3143-50.

**Huang CC, Hou Y, Woods LK, Moore GE, Minowada J. (1994)** Cytogenetic study of human lymphoid T-cell lines derived from lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*, 53(3):655-60.

**Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J. (1979)** Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer*, 23(2):174-80.

**Jaenisch R, Bird A. (2003)** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl:245-54. Review.

**Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, Henrique D, Parreira L. (2001)** Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med*, 194(7):991-1002.

**Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. (1995)** Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, 377(6547):355-8.

**Johnson SE, Shah N, Bajer AA, LeBien TW. (2008)** IL-7 activates the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in normal human thymocytes but not normal human B cell precursors. *J Immunol*, 180(12):8109-17.

**Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T. (1998)** A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev*, 12(15):2269-77.

**Kawamoto H, Katsura Y. (2009)** A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol*, 30(5):193-200.

**Kinsella TM, Nolan GP. (1996)** Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther*, 7(12):1405-13.

**Kitahara T, et al., (1978)** *Acta Haematol Jpn* 41: 140.

**Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gessler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, Macdonald HR, Radtke F. (2008)** Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med*, 205(11):2515-23.

**Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997)** Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5):661-72.

**Kopan R, Ilagan MX. (2009)** The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2):216-33.

**Korte A, Köchling J, Badiali L, Eckert C, Andreae J, Geilen W, Kebelmann-Betzing C, Taube T, Wu S, Henze G, Seeger K. (2000)** Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7Ralpha chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood ALL. *Cytokine*, 12(11):1597-608.

- Kraft DL, Weissman IL, Waller EK. (1993)** Differentiation of CD3-4-8- human fetal thymocytes in vivo: characterization of a CD3-4+8- intermediate. *J Exp Med*, 178(1):265-77.
- Laouar Y, Crispe IN, Flavell RA. (2004)** Overexpression of IL-7R alpha provides a competitive advantage during early T-cell development. *Blood*, 103(6):1985-94.
- Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellingsworth LR, Kincade PW. (1989)** Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. *J Immunol*, 142(11):3875-83.
- Lehar SM, Dooley J, Farr AG, Bevan MJ. (2005)** Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood*, 105(4):1440-7.
- Leonard WJ. (2001)** Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol*, 1(3):200-8.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. (2007)** Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 7(9):673-83.
- Lewis HD, Leveridge M, Strack PR, Haldon CD, O'neil J, Kim H, Madin A, Hannam JC, Look AT, Kohl N, Draetta G, Harrison T, Kerby JA, Shearman MS, Behr D. (2007)** Apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia cells after cell cycle arrest induced by pharmacological inhibition of notch signaling. *Chem Biol*, 14(2):209-19.
- Li K, Li Y, Wu W, Gordon WR, Chang DW, Lu M, Scoggin S, Fu T, Vien L, Histen G, Zheng J, Martin-Hollister R, Duensing T, Singh S, Blacklow SC, Yao Z, Aster JC, Zhou BB. (2008)** Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3. *J Biol Chem*, 283(12):8046-54.
- Li X, Gounari F, Protopopov A, Khazaie K, von Boehmer H. (2008)** Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med*, 205(12):2851-61.
- Liefke R, Oswald F, Alvarado C, Ferres-Marco D, Mittler G, Rodriguez P, Dominguez M, Borggrefe T. (2010)** Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch-RBP-J repressor complex. *Genes Dev*, 24(6):590-601.
- Lilleyman JS, Sugden PJ. (1981)** T lymphoblastic leukaemia and the central nervous system. *Br J Cancer*, 43(3):320-3.
- Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS. (1981)** A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 166(4):546-50.
- Magri M, Yatim A, Benne C, Balbo M, Henry A, Serraf A, Sakano S, Gazzolo L, Lévy Y, Lelièvre JD. (2009)** Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur J Immunol*, 39(5):1231-40.
- Mahajan R, El-Omar EM, Lissowska J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, Yeager M, Sobin LH, Zatonski W, Channock SJ, Chow WH, Hou L. (2008)** Genetic variants in T helper cell type 1, 2 and 3 pathways and gastric cancer risk in a Polish population. *Jpn J Clin Oncol*, 38(9):626-33.
- Maillard I, Fang T, Pear WS. (2005)** Regulation of lymphoid development, differentiation and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol*, 23: 945-974.
- Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, Pear WS. (2008)** Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2(4):356-66.
- Maillard I, Tu L, Sambandam A, Yashiro-Ohtani Y, Millholland J, Keeshan K, Shestova O, Xu L, Bhandoola A, Pear WS. (2006)** The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-Tcell receptor. *J Exp Med*, 203(10):2239-45.

**Mansour MR**, Linch DC, Foroni L, Goldstone AH, Gale RE. (2006) High incidence of Notch-1 mutations in adult patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 20(3):537-9.

**Maraskovsky E**, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschon JJ, Strasser A. (1997) Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1-/- mice. *Cell*, 89(7):1011-9.

**Maraskovsky E**, Peschon JJ, McKenna H, Teepe M, Strasser A. (1998) Overexpression of Bcl-2 does not rescue impaired B lymphopoiesis in IL-7 receptor-deficient mice but can enhance survival of mature B cells. *Int Immunol*, 10(9):1367-75.

**Markman B**, Capdevila J, Elez E, Tabernero J. (2009) New trends in epidermal growth factor receptor-directed monoclonal antibodies. *Immunotherapy*, 1(6):965-82. Review.

**Márquez C**, Trigueros C, Fernández E, Toribio ML. (1995) The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med*, 181(2):475-83.

**Márquez C**, Trigueros C, Franco JM, Ramiro AR, Carrasco YR, López-Botet M, Toribio ML. (1998) Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*, 91(8):2760-71.

**Milano J**, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, Jacobs RT, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio PJ. (2004) Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci*, 82(1):341-58.

**Minowada J**. (1988) Leukemia cell lines. *Cancer Rev*.10:1-18.

**Misslitz A**, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT, Förster R. (2004) Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med*, 200(4):481-91

**Mittal S**, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A. (2009) Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer*, 8:128

**Moellering RE**, Cornejo M, Davis TN, Del Bianco C, Aster JC, Blacklow SC, Kung AL, Gilliland DG, Verdine GL, Bradner JE. (2009) Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature*, 462(7270):182-8. Erratum in: *Nature*. 2010 Jan 21;463(7279):384.

**Montagut C**, Settleman J. (2009) Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett*, 283(2):125-34.

**Morikawa S**, Tatsumi E, Baba M, Harada T, Yasuhira K.(1978) Two E-rosette-forming lymphoid cell lines.*Int J Cancer*, 21(2):166-70.

**Munitic I**, Williams JA, Yang Y, Dong B, Lucas PJ, El Kassar N, Gress RE, Ashwell JD. (2004) Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood*, 104(13):4165-72.

**Murphy G**. (2008) The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 8(12):929-41. Review.

**Nam Y**, Sliz P, Song L, Aster JC, Blacklow SC. (2006) Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell*, 124(5):973-83.

**Oberg C**, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U.(2001) The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem*, 276(38):35847-53.

- O'Doherty C**, Alloza I, Rooney M, Vandenbroeck K. (2009) IL7RA polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies. *Tissue Antigens*, 74(5):429-31.
- Ohishi K**, Varnum-Finney B, Bernstein I.D. (2002) Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest*, 110(8):1165-74.
- O'Neil J**, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink JP, Pieters R, Draetta G, Sears R, Clurman BE, Look AT. (2007) FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*, 204(8):1813-24.
- O'Neil J**, Look AT. (2007) Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene*, 26(47):6838-49.
- Osborne BA**, Minter LM. (2007) Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol*, 7(1):64-75.
- Oswald F**, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, Liptay S, Schmid RM. (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J*, 21(20):5417-26.
- Pallard C**, Stegmann AP, van Kleffens T, Smart F, Venkitaraman A, Spits H. (1999) Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity*, 10(5):525-35.
- Palomero T**, Barnes KC, Real PJ, Glade Bender JL, Sulis ML, Murty VV, Colovai AI, Balbin M, Ferrando AA. (2006a) CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia*, 20(7):1279-87.
- Palomero T**, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. (2006b) NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48):18261-6.
- Palomero T**, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zúñiga-Pflücker JC, Dominguez M, Ferrando AA. (2007) Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leucemia. *Nat Med*, 13(10):1203-10.
- Parreira L**, Neves H, Simões S. (2003) Notch and lymphopoiesis: a view from the microenvironment. *Semin Immunol*, 15(2):81-9. Review.
- Pear WS**, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. (1996) Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*, 183(5):2283-91.
- Peschon JJ**, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. (1994) Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*, 180(5):1955-60.
- Pleiman CM**, Gimpel SD, Park LS, Harada H, Taniguchi T, Ziegler SF. (1991) Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter. *Mol Cell Biol*, 11(6):3052-9.
- Plotkin J**, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. (2003) Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol*, 171(9):4521-7.
- Plum J**, De Smedt M, Leclercq G, Verhasselt B, Vandekerckhove B. (1996) Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood*, 88(11):4239-45.

**Porcu M, Gielen O, Cools J, De Keersmaecker K. (2009)** JAK1 mutation analysis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Haematologica*, 94(3):435-7.

**Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. (2004)** Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*, 20(6): 735-45.

**Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. (1998)** Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*, 20(4):394-7.

**Pui CH, Relling MV, Downing JR. (2004)** Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 350(15):1535-48.

**Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. (1999)** Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, 11(3):299-308.

**Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. (1999)** Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*, 10(5):547-58.

**Ramirez CB, Marino IR. (2007)** The role of basiliximab induction therapy in organ transplantation. *Expert Opin Biol Ther*, 7(1):137-48. Review.

**Ramiro AR, Trigueros C, Márquez C, San Millán JL, Toribio ML. (1996)** Regulation of pre-T cell receptor (pTalpha-TCRbeta) gene expression during human thymic development. *J Exp Med*, 184(2):519-30.

**Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. (2001)** Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*, 20(13):3427-36.

**Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, de Stanchina E, Sulis ML, Barnes K, Sawai C, Homminga I, Meijerink J, Aifantis I, Basso G, Cordon-Cardo C, Ai W, Ferrando A. (2009)** Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 15(1):50-8.

**Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA. (2000)** Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, 275(19):14608-14.

**Reizis B, Leder P. (2002)** Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev*, 16(3):295-300.

**Res P, Blom B, Hori T, Weijer K, Spits H. (1997)** Downregulation of CD1 marks acquisition of functional maturation of human thymocytes and defines a control point in late stages of human T cell development. *J Exp Med*, 185(1):141-51.

**Res P, Martínez-Cáceres E, Cristina Jaleco A, Staal F, Noteboom E, Weijer K, Spits H. (1996)** CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood*, 87(12):5196-206.

**Ronchini C, Capobianco AJ. (2001)** Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol*, 21(17):5925-34.

**Rosenfeld C, Goutner A, Venuat AM, Choquet C, Pico JL, Dore JF, Liabeuf A, Durandy A, Desgrange C, De The G. (1977)** An effect human leukaemic cell line: Reh. *Eur J Cancer*, 13(4-5):377-9.



- Rothenberg EV. (2007)** Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity*, 26(6):690-702.
- Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. (2005)** Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol*, 6:663-670.
- Sánchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG, Lanier LL, Phillips JH. (1994)** Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med*, 180(2):569-76.
- Sasson SC, Smith S, Seddiki N, Zaunders JJ, Bryant A, Koelsch KK, Weatherall C, Munier ML, McGinley C, Yeung J, Mulligan SP, Moore J, Cooper DA, Milliken S, Kelleher AD. (2010)** IL-7 receptor is expressed on adult pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and other B-cell derived neoplasms and correlates with expression of proliferation and survival markers. *Cytokine*, 50: 58-68.
- Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. (2000)** Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol*, 1(5): 426-32.
- Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. (2002)** Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity*, 17: 749-756.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. (1977)** Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19(5):621-6.
- Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, Galbreath EJ, Schirtzinger LM, Berridge BR, Gao H, Higgins MA, May PC, Ryan TP. (2003)** Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor. *J Biol Chem*, 278(46):46107-16.
- Shortman K, Wu L. (1996)** Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol*, 14:29-47.
- Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ, Scollay R. (1990)** The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*, 2:3-12.
- Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT. (2008)** PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest*, 118(11):3762-74.
- Smith SD, Morgan R, Link MP, McFall P, Hecht F. (1986)** Cytogenetic and immunophenotypic analysis of cell lines established from patients with T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 67(3):650-6.
- Soulier J, Clappier E, Cayuela JM, Regnault A, García-Peydró M, Dombret H, Baruchel A, Toribio ML, Sigaux F. (2005)** HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*, 106(1):274-86.
- Stankovic A, Dincic E, Ristic S, Lovrecic L, Starcevic Cizmurevic N, Djuric T, Sepcic J, Kapovic M, Raicevic R, Peterlin B, Alavantic D, Zivkovic M. (2010)** Interleukin 7 receptor alpha polymorphism rs6897932 and susceptibility to multiple sclerosis in the Western Balkans. *Mult Scler*, 16(5):533-6.
- Sudo T, Nishikawa S, Ohno N, Akiyama N, Tamakoshi M, Yoshida H, Nishikawa S. (1993)** Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19): 9125-9.
- Sundström C and Nilsson K. (1976)** Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*, 17(5):565-77.

**Taghon T**, Van de Walle I, De Smet G, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B, Plum J. (2009) Notch signaling is required for proliferation but not for differentiation at a well-defined beta-selection checkpoint during human T-cell development. *Blood*, 113(14):3254-63.

**Tan JB**, Visan I, Yuanand JS, Guidos CJ. (2005) Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol*, 6: 671-679.

**Thompson BJ**, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A, Aifantis I. (2007) The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med*, 204(8):1825-35.

**Tian L**, Wu X, Chi C, Han M, Xu T, Zhuang Y. (2008) ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development. *Int Immunol*, 20(9):1181-7.

**Timmerman LA**, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL. (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, 18(1):99-115.

**Todd JA**, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszek JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 39(7):857-64.

**Trigueros C**, Ramiro AR, Carrasco YR, de Yébenes VG, Albar JP, Toribio ML. (1998) Identification of a late stage of small noncycling pTalpha- pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor alpha/beta+ thymocytes. *J Exp Med*, 188(8):1401-12.

**Tsuganezawa K**, Kiyokawa N, Matsuo Y, Kitamura F, Toyama-Sorimachi N, Kuida K, Fujimoto J, Karasuyama H. (1998) Flow cytometric diagnosis of the cell lineage and developmental stage of acute lymphoblastic leukemia by novel monoclonal antibodies specific to human pre-B-cell receptor. *Blood*, 92(11):4317-24.

**Tun T**, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, Kawauchi M. (1994) Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res*, 22(6):965-71.

**Van de Walle I**, De Smet G, De Smedt M, Vandekerckhove B, Leclercq G, Plum J, Taghon T. (2009) An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alphabeta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood*, 113(13):2988-98.

**Van De Wiele CJ**, Marino JH, Murray BW, Vo SS, Whetsell ME, Teague TK. (2004) Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J Immunol*, 172(7): 4235-44.

**van Tetering G**, van Diest P, Verlaan I, van der Wall E, Kopan R, Vooijs M. (2009) Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem*, 284(45):31018-27. Erratum in: *J Biol Chem*. 2010 Apr 9;285(15):11754.

**Van Vlierberghe P**, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo M, Van Roy N, De Moerloose B, Philippé J, González-García S, Toribio ML, Taghon T, Zuurbier L, Cauwelier B, Harrison CJ, Schwab C, Pisecker M, Strehl S, Langerak AW, Gecz J, Sonneveld E, Pieters R, Paietta E, Rowe JM, Wiernik PH, Benoit Y, Soulier J, Poppe B, Yao X, Cordon-Cardo C, Meijerink J, Rabadan R, Speleman F, Ferrando A. (2010) PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 42(4):338-42.

**Vilimas T**, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, Meng F, Thompson B, Spaulding C, Macaroun S, Alegre ML, Kee BL, Ferrando A, Miele L, Aifantis I. (2007) Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med*, 13(1):70-7.

**von Boehmer H**, Fehling HJ. (1997) Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol*, 15:433-52.

**von Freeden-Jeffry U**, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SEG, Murray R. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*, 181:1519.

**Wada H**, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y, Kawamoto H. (2008) Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature*, 452(7188):768-72.

**Washburn T**, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, Robey E. (1997) Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell*, 88(6):833-43.

**Weng AP**, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsner D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. (2006) c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*, 20(15):2096-109.

**Weng AP**, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC, Aster JC. (2003) Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol*, 23(2):655-6.

**Weng AP**, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694):269-71.

**Wolfer A**, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR, Radtke F. (2001) Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat Immunol*, 2(3):235-41. Erratum in: *Nat Immunol* 2001; 2(5):467.

**Wolfer A**, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, Radtke F. (2002) Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta lineage thymocytes. *Immunity*, 16(6):869-79.

**Wu L**, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD. (2002) Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. *Mol Cell Biol*, 22(21):7688-700.

**Wu Y**, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan M, Zha J, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW. (2010) Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*, 464:1052-57.

**Xue HH**, Bollenbacher J, Rovella V, Tripuraneni R, Du YB, Liu CY, Williams A, McCoy JP, Leonard WJ. (2004) GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells. *Nat Immunol*, 5(10):1036-44.

**Ye SK**, Maki K, Kitamura T, Sunaga S, Akashi K, Domen J, Weissman IL, Honjo T, Ikuta K. (1999) Induction of germline transcription in the TCRgamma locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity*, 11(2):213-23.

**Yu Q**, Erman B, Park JH, Feigenbaum L, Singer A. (2004) IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med*, 200(6): 797-803.

**Yu Q**, Park JH, Doan LL, Erman B, Feigenbaum L, Singer A. (2006) Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med*, 203(1): 165-75.

**Yu S**, Zhao DM, Jothi R, Xue HH. (2010) Critical requirement of GABPalph $\alpha$  for normal T cell development. *J Biol Chem*, 285(14):10179-88.

**Zamisch M**, Moore-Scott B, Su DM, Lucas PJ, Manley N, Richie ER. (2005) Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol*, 174(1):60-7.

**Zuvich RL**, McCauley JL, Oksenberg JR, Sawcer SJ, De Jager PL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Aubin C, Cross AH, Piccio L, Aggarwal NT, Evans D, Hafler DA, Compston A, Hauser SL, Pericak-Vance MA, Haines JL. (2010) Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. *Hum Genet*, 127(5):525-35.

***ANEXOS***



La realización de esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

- Navarro MN, Nusspaumer G, Fuentes P, González-García S, Alcain J, Toribio ML.(2007). "Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pTalpha chain involved in pre-TCR function". *Blood*, 110 (13):4331-4341.
- González-García S, García-Peydró M, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, de la Pompa JL, Ferrando A and Toribio ML. (2009). "CSL/MAML1-dependent Notch1 signaling controls T-lineage specific IL-7Ra gene expression in early human thymopoiesis and leukemia". *Journal of Experimental Medicine*, 206(4):779-91.
- González-García S and Toribio ML. (2009) "Notch1 signalling in human T-cell development and leukemia". *Inmunología*, 28 (4): 193-208.
- Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabanian H, Van der Meulen J, Castillo M, Van Roy N, De Moerloose B, Philippé J, González-García S, *et al.* (2010). "PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Nature Genetics*, 42(4):338-42.
- Esteve P, Sandonís A, Cardozo M, Malapeira J, Ibañez C, Crespo I, Marcos S, González-García S, Toribio ML, Arribas J, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P. (2011) "SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis". *Nature Neurosciences*, 2011 May;14(5):562-9. Epub 2011 Apr





# blood

2007 110: 4331-4340  
Prepublished online Sep 6, 2007;  
doi:10.1182/blood-2007-06-094938

## Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pT{alpha} chain involved in pre-TCR function

María N. Navarro, Gretel Nusspaumer, Patricia Fuentes, Sara González-García, Juan Alcain and María L. Toribio

---

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/110/13/4331>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Immunobiology](#) (4316 articles)

[Signal Transduction](#) (1930 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



## Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pT $\alpha$ chain involved in pre-TCR function

María N. Navarro,<sup>1</sup> Gretel Nusspaumer,<sup>1</sup> Patricia Fuentes,<sup>1</sup> Sara González-García,<sup>1</sup> Juan Alcain,<sup>1</sup> and María L. Toribio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

The T-cell receptor  $\beta$  (TCR $\beta$ )/pre-TCR $\alpha$  (pT $\alpha$ ) pre-TCR complex (pre-TCR) signals the expansion and differentiation of developing thymocytes. Functional properties of the pre-TCR rely on its unique pT $\alpha$  chain, which suggests the participation of specific intracellular adaptors. However, pT $\alpha$ -interacting molecules remain unknown. Here, we identified a polyproline-arginine sequence in the human pT $\alpha$  cytoplasmic tail that interacted in vitro with SH3 domains of the CIN85/CMS family of adaptors, and mediated the recruitment of multiprotein complexes

involving all (CMS, CIN85, and CD2BP3) members. Supporting the physiologic relevance of this interaction, we found that 1 such adaptor, CMS, interacted in vivo with human pT $\alpha$ , and its expression was selectively up-regulated during human thymopoiesis in pre-TCR-activated thymocytes. Upon activation, pre-TCR clustering was induced, and CMS and polymerized actin were simultaneously recruited to the pre-TCR activation site. CMS also associated via its C-terminal region to the actin cytoskeleton in the endocytic compartment, where it colocal-

ized with internalized pT $\alpha$  in traffic to lysosomal degradation. Notably, deletion of the pT $\alpha$  CIN85/CMS-binding motif impaired pre-TCR-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization and NFAT transcriptional activity, and precluded activation induced by overexpression of a CMS-SH3 N-terminal mutant. These results provide the first molecular evidence for a pT $\alpha$  intracellular adaptor involved in pre-TCR function. (Blood. 2007;110:4331-4340)

© 2007 by The American Society of Hematology

### Introduction

Intrathymic differentiation of  $\alpha\beta$  T lymphocytes is a complex process regulated at 2 consecutive checkpoints through the pre-T-cell receptor (TCR) and the  $\alpha\beta$  TCR.<sup>1,2</sup> Surface expression of the TCR  $\beta$ -pre-TCR $\alpha$  (pT $\alpha$ ) pre-TCR heterodimer (pre-TCR) signals the expansion and further differentiation of developing pre-T cells, a process called  $\beta$ -selection.<sup>3-5</sup> Thereafter, replacement of the pre-TCR by the mature TCR $\alpha\beta$  allows for positive and negative selection of developing thymocytes.<sup>1,2</sup>

The similar biochemical composition of the pre-TCR and the TCR $\alpha\beta$  initially supported the view that pT $\alpha$  is simply a “surrogate” TCR $\alpha$  chain. However, pT $\alpha$  and TCR $\alpha$  are not interchangeable partners of TCR $\beta$  during T-cell development.<sup>6,7</sup> Rather, the pT $\alpha$  molecule endows the pre-TCR with unique functional properties, such as constitutive clustering and ligand-independent activation,<sup>5,8-11</sup> which likely occur through oligomerization mediated by the pT $\alpha$  extracellular (EC) domain.<sup>12</sup> Other pT $\alpha$  structural features that could account for the unique functional properties of the pre-TCR rely on the presence of a long cytoplasmic tail that could mediate pre-TCR signaling. However, despite being highly conserved at the EC and transmembrane (TM) domains, mouse and human pT $\alpha$  differ significantly at the cytoplasmic (CT) domain (30 and 114 amino acids, respectively). This difference, together with experimental data in mice, initially diminished the functional relevance of the pT $\alpha$  CT domain.<sup>13,14</sup> In contrast, the human pT $\alpha$  CT domain was shown to serve an endoplasmic reticulum retention function that regulated pre-TCR assembly and expression.<sup>15</sup> Moreover, constitutive pre-TCR internalization and degradation<sup>16,17</sup> was

also dependent on the pT $\alpha$  CT domain in humans.<sup>16</sup> Despite these initial discrepancies, more recent data have pointed to an essential and previously unappreciated functional role for the CT tail of pT $\alpha$  also in mice, since the C-terminal (C-term) portion of murine pT $\alpha$  was proved to be crucial for intrathymic development.<sup>18</sup> What exactly the pT $\alpha$  CT domain does to promote pre-TCR signaling remains an open question, but proper pre-TCR function seems to require the contribution of 2 proline-rich sequences present in its C-term portion.<sup>18</sup> It is thus likely that polyproline sequences within the pT $\alpha$  tail directly interact with molecules that could propagate signals emanating from the pre-TCR. Therefore, the characterization of those intracellular adaptors would be essential to understand the basis of the unique signaling properties of the pre-TCR. However, proteins that associate with the pT $\alpha$  cytoplasmic domain have not been identified as yet.

The proline-rich tandem repeat (PPTHR and PPSRK) present within the murine pT $\alpha$  CT domain is conserved as a single sequence (PPGRK) in humans.<sup>4</sup> Although different from the consensus PXXP or PPLP SH3-binding motifs, this sequence displays some homology with 2 tandem PPGHR sequences within the CT tail of the costimulatory molecule CD2.<sup>4,18</sup> In mature T cells, this region is responsible for the direct interaction of CD2 with the intracellular adaptor CD2BP2, which is involved in signal transduction.<sup>19</sup> Additional molecules interact with the CD2 CT tail through distinct proline-rich domains, including the CD2BP1 adaptor, implicated in actin polymerization and T-cell adhesion, motility, and activation<sup>20-22</sup>; and CMS and CIN85, 2 members of

Submitted June 8, 2007; accepted August 30, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 6, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-06-094938.

An Inside *Blood* analysis of this article appears at the front of this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

# CSL–MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage–specific IL-7R $\alpha$ gene expression in early human thymopoiesis and leukemia

Sara González-García,<sup>1</sup> Marina García-Peydró,<sup>1</sup> Enrique Martín-Gayo,<sup>1</sup> Esteban Ballestar,<sup>2</sup> Manel Esteller,<sup>2</sup> Rafael Bornstein,<sup>3</sup> José Luis de la Pompa,<sup>4</sup> Adolfo A. Ferrando,<sup>5</sup> and María L. Toribio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid 28029, Spain

<sup>3</sup>Madrid Cord Blood Bank and Department of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain

<sup>4</sup>Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid 28049, Spain

<sup>5</sup>Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York, NY 10032

**Notch1 activation is essential for T-lineage specification of lymphomyeloid progenitors seeding the thymus. Progression along the T cell lineage further requires cooperative signaling provided by the interleukin 7 receptor (IL-7R), but the molecular mechanisms responsible for the dynamic and lineage-specific regulation of IL-7R during thymopoiesis are unknown. We show that active Notch1 binds to a conserved CSL-binding site in the human *IL7R* gene promoter and critically regulates *IL7R* transcription and IL-7R  $\alpha$  chain (IL-7R $\alpha$ ) expression via the CSL–MAML complex. Defective Notch1 signaling selectively impaired IL-7R $\alpha$  expression in T-lineage cells, but not B-lineage cells, and resulted in a compromised expansion of early human developing thymocytes, which was rescued upon ectopic IL-7R $\alpha$  expression. The pathological implications of these findings are demonstrated by the regulation of IL-7R $\alpha$  expression downstream of Notch1 in T cell leukemias. Thus, Notch1 controls early T cell development, in part by regulating the stage- and lineage-specific expression of IL-7R $\alpha$ .**

## CORRESPONDENCE

María L. Toribio:  
mtoribio@cbm.uam.es

Abbreviations used:  $\gamma$ c, common cytokine receptor  $\gamma$ ; CB, cord blood; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CompE, compound E; DN, double negative; dnMAML1, dominant-negative MAML1; DP, double positive; ETP, early thymic progenitor; FTOC, fetal thymic organ culture; GABP, GA binding protein; GSI,  $\gamma$ -secretase inhibitor; ICN1, intracellular Notch1; MEF, mouse embryonic fibroblast; MFI, mean fluorescence intensity; mRNA, messenger RNA; T-ALL, T cell acute lymphoblastic leukemia.

The development of T cells is a tightly regulated process guided by inductive signals provided by the thymic microenvironment (1). The interaction of Notch1 with Delta-like ligands expressed by the thymic epithelium is an initial obligatory event for lymphomyeloid progenitors seeding the thymus to undergo T cell specification and diversion away from alternative cell fates (1–3). Thereafter, recurrent Notch–ligand interactions are required for intrathymic early thymic progenitors (ETPs) to maintain T cell specification and to support further development along the T cell lineage (4–6). During this maturation process, ETPs that are CD4<sup>+</sup>CD8<sup>−</sup> double negative (DN) and either CD44<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup>CD117<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>−</sup>CD33<sup>+</sup> in mice or humans, respectively, differentiate into DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>) and DN3 (CD44<sup>−</sup>CD25<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD3<sup>−</sup> immature single positive) thymocytes (1, 3, 7). Progression beyond the DN3

stage and irreversible T cell commitment is accomplished by signaling through a pre-TCR that promotes survival, proliferation, and further differentiation to the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) stage (8). This developmental checkpoint, known as  $\beta$  selection, also depends on cooperative signaling provided by Notch1 (9). Therefore, Notch activation is crucial early in thymopoiesis for the induction and maintenance of T cell specification within the DN intrathymic compartment and, later on, for the functional outcomes of  $\beta$  selection.

Besides the pre-TCR-dependent phase of thymocyte expansion at the  $\beta$ -selection checkpoint, there is an early phase of extensive proliferation of the intrathymic pool of T cell precursors

© 2009 González-García et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

in response to IL-7 (10, 11). Binding of IL-7 to its receptor (IL-7R), which is composed of an  $\alpha$ -chain (IL-7R $\alpha$ ) associated to the common cytokine receptor  $\gamma$  ( $\gamma$ c) chain (12), plays a conserved nonredundant role by promoting the survival and proliferation of DN progenitors (10, 13–16). IL-7, however, is dispensable for differentiation beyond the DN3 stage, although it may be required later on during positive selection of CD8<sup>+</sup> cells (11, 17, 18). Thus, besides Notch1 signals, IL-7–IL-7R $\alpha$  interactions provide additional thymic signals that are critical for the development of thymocytes before the DP stage.

The stage-specific function of IL-7 during intrathymic development is accomplished by a tight regulation of IL-7R $\alpha$  expression. IL-7R $\alpha$  is first induced during thymopoiesis in late ETPs in transit to DN2, it declines steadily after the DN2 stage and must be terminated before transition to the DP stage, but it is reexpressed after positive selection in single-positive thymocytes (2, 11, 17–20). Still, the molecular bases of the dynamic regulation of IL-7R $\alpha$  expression during thymopoiesis remain poorly understood. In early lymphoid precursors and B cell progenitors of mice, IL-7R $\alpha$  gene (*Il7ra*) transcription is regulated by the Ets family transcription factor PU.1 (21). However, PU.1 down-regulation is specifically required for progression in the T cell lineage (22), and another Ets factor, GA binding protein (GABP), was shown to regulate IL-7R $\alpha$  expression in T cells (23). Nonetheless, neither expression nor function of GABP is T-lineage specific. Rather, GABP regulates IL-7R $\alpha$  expression in pre-B and committed B cells as well and has recently been proven to be a critical regulator of B cell development (24, 25). Therefore, the molecular mechanism responsible for the dynamic and T-lineage-specific regulation of IL-7R $\alpha$  expression remains to be identified. In this paper, we provide evidence that Notch1 accomplishes this function during T cell development. We show that active Notch1 directly regulates human IL-7R $\alpha$  gene (*IL7R*) transcription and critically controls the IL-7–dependent expansion of the intrathymic pool of early DN T cell progenitors in human thymopoiesis as well as the IL-7–induced proliferation of T cell leukemias.

## RESULTS

### Notch1 signaling up-regulates IL-7R $\alpha$ expression in hematopoietic precursors

In both mouse and human thymopoiesis, Notch1-induced T-lineage specification parallels the induction of IL-7R $\alpha$  expression and IL-7 dependency. We thus wanted to investigate whether IL-7R $\alpha$  expression in early thymopoiesis is a direct consequence of Notch1 activation rather than a byproduct of progression toward the T cell lineage. To this end, we first analyzed the impact of Notch1 signaling on surface levels of IL-7R $\alpha$  expressed on human ETPs developing in a hybrid human/mouse fetal thymic organ culture (FTOC). Thus, sorted ETPs were infected either with a bicistronic retroviral vector encoding the intracellular active form of Notch1 (intracellular Notch1 [ICN1]) and GFP as a reporter, or with a GFP-only control vector (26), and IL-7R $\alpha$  expression was then analyzed by flow cytometry on the ETP progeny arising in a FTOC assay.

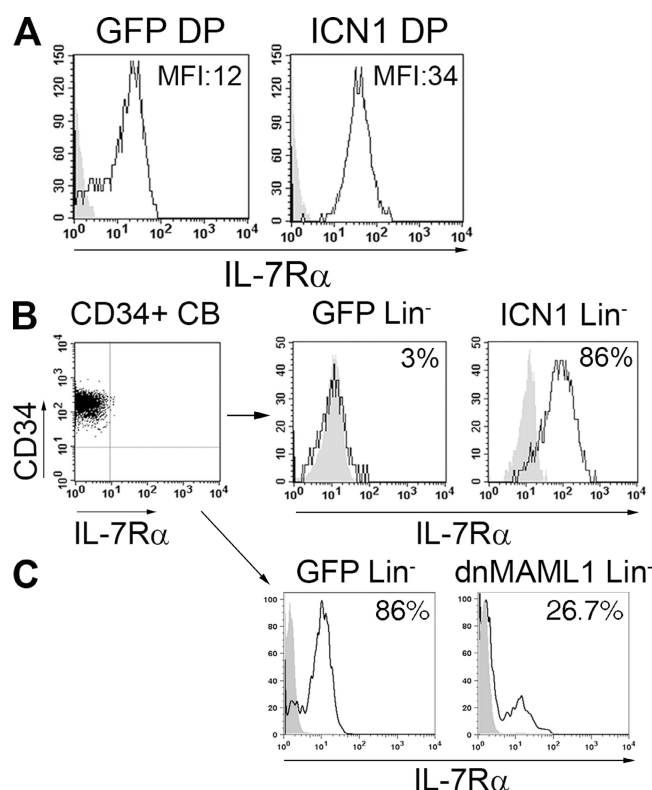
Supporting a direct role of Notch1 in IL-7R $\alpha$  expression, we found that ectopic expression of ICN1 consistently resulted in the generation of DP thymocytes with up-regulated IL-7R $\alpha$ , as compared with the GFP-transduced controls (fold increase of mean fluorescence intensity [MFI]  $\pm$  SEM:  $2.26 \pm 0.28$  from three independent experiments; Fig. 1 A). More importantly, similar approaches showed that IL-7R $\alpha$  was induced de novo on the major cell progeny (>95%) arising in multicytokine cultures (27) from ICN1-transduced human CD34<sup>+</sup> cord blood (CB) multipotent precursors, which displayed a homogeneous lineage-negative (Lin<sup>−</sup>) phenotype (i.e., CD1a<sup>−</sup>, CD2<sup>−</sup>, CD3<sup>−</sup>, CD4<sup>−</sup>, CD5<sup>−</sup>, CD7<sup>−</sup>, CD8<sup>−</sup>, CD13<sup>−</sup>, CD14<sup>−</sup>, CD19<sup>−</sup>, CD33<sup>lo</sup>, CD34<sup>−</sup>, CD56<sup>−</sup>, CD116<sup>−</sup>, CD122<sup>−</sup>, and TCR- $\beta$ <sup>−</sup>). In contrast, no IL-7R $\alpha$  was expressed on the equivalent Lin<sup>−</sup> population derived from control CB precursors transduced with GFP (Fig. 1 B), which represented a minor proportion (5%) of the GFP<sup>+</sup> progeny (95% CD13<sup>+</sup> myeloid cells). Loss-of-function experiments were then performed to establish whether Notch-deficient progenitors had defects in IL-7R $\alpha$  expression. Thus, Notch signaling was inhibited in CD34<sup>+</sup> CB cells by ectopic expression of a dominant-negative mutant form of the Notch coactivator MAML1 (dominant-negative MAML1 [dnMAML1]) fused to GFP (28), and dnMAML1<sup>+</sup> cells were then analyzed for their capacity to acquire surface IL-7R $\alpha$  under optimal culture conditions, using the OP9-DL1 coculture system (29). As shown in Fig. 1 C, control CD34<sup>+</sup> progenitors transduced with GFP-only vectors gave rise to a major Lin<sup>−</sup> progeny (i.e., CD3<sup>−</sup>, CD13<sup>−</sup>, CD19<sup>−</sup>, and CD56<sup>−</sup>; 90% by day 22), which expressed IL-7R $\alpha$  (>85% of cells). In contrast, the equivalent Lin<sup>−</sup> progeny of dnMAML1<sup>+</sup> precursors (70%) were markedly impaired in their capacity to express IL-7R $\alpha$  (<25%). Overall, these results indicate that Notch1 signaling can up-regulate IL-7R $\alpha$  expression in primary human hematopoietic progenitors.

### Inhibition of Notch1 signaling specifically impairs *IL7R* gene expression in T-lineage cells

To next investigate whether up-regulation of IL-7R $\alpha$  by Notch1 resulted from direct induction at the transcriptional level, we first used the T cell line Jurkat as a clonal model in which ectopic ICN1 expression resulted in IL-7R $\alpha$  up-regulation at the cell surface (27). We found that *IL7R* messenger RNA (mRNA) expression was markedly increased in ICN1-transduced cells, as compared with GFP-only-transduced controls (Fig. S1), indicating that Notch1 signaling is able to control *IL7R* gene expression. Because *IL7R* transcription is a hallmark of lymphoid progenitors developing along either the T or the B cell lineages, it was important to investigate whether regulation of *IL7R* mRNA expression by Notch1 is common to T and B cell lymphocyte precursors or restricted to T-lineage cells. Thus, we analyzed two human cell lines that constitutively express surface IL-7R $\alpha$ , namely SupT1 and REH (Fig. 2 A), as prototypes of pre-T (30, 31) and pre-B cells (32), respectively, and asked whether *IL7R* mRNA expression was affected upon Notch signaling inhibition by dnMAML1. We found that disruption of Notch1 signaling,



as assessed by decreased expression of *HES1*, resulted in a marked down-regulation of surface IL-7R $\alpha$  on SupT1 pre-T cells, which correlated with decreased *IL7R* mRNA levels; however, dnMAML1 did not affect IL-7R $\alpha$  and mRNA expression in REH pre-B cells (Fig. 2, A and B). Quantitative PCR analyses showed that expression of *IL2RG* gene encoding the IL-7R  $\gamma$ c chain remained essentially unchanged in either cell line (Fig. 2 B), supporting a specific effect of Notch1 on *IL7R* expression in SupT1 cells. Consistently, SupT1 cells, but not REH cells, expressed detectable levels of endogenous active Notch1 (Fig. S1). As a whole, these data, together with similar results obtained from additional T-lineage (CUTLL1) and B-lineage (NALM-6) cell lines (Fig. S1), support the notion that regulation of *IL7R* expression by Notch1 is T-lineage specific.



**Figure 1. Notch1 signaling regulates IL-7R $\alpha$  expression in human hematopoietic precursors.** (A) Flow cytometry of IL-7R $\alpha$  expression on electronically gated GFP<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) thymocytes derived from ETPs transduced with either ICN1-GFP or GFP-only vectors in an FTOC assay (day 13). (B) IL-7R $\alpha$  expression on primary CD34<sup>+</sup> CB progenitors (left) and on electronically gated GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> progenies, derived from CD34<sup>+</sup> progenitors transduced with either ICN1-GFP or GFP-only vectors and cultured with multilineage-supportive cytokines for 15 d (right). (C) IL-7R $\alpha$  expression levels on electronically gated GFP<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> progenies derived from CD34<sup>+</sup> progenitors transduced with either dnMAML1-GFP or GFP-only vectors and cocultured on OP9-DL1 stroma for 22 d. Shaded histograms represent background staining with irrelevant isotype-matched antibodies. Numbers in quadrants represent MFI values (A) and percentages of positive cells (B and C). Results are representative of at least three independent experiments.

### Active Notch1 interacts with a CSL-binding site in the *IL7R* promoter and induces *IL7R* transcription

To examine whether Notch1 directly activates *IL7R* gene expression, luciferase reporter assays were performed using a vector in which we cloned a 2-kb fragment encoding the 5' upstream regulatory region of human *IL7R* (Fig. 3 A). Cotransfection of this reporter, along with a retroviral vector encoding ICN1 in two distinct cell lines, 293T and Jurkat, resulted in a significant increase of luciferase activity compared with GFP-transfected controls (Fig. 3, B and C). Notably, cotransfection of dnMAML1 with ICN1 abrogated *IL7R* promoter activation (Fig. 3 C). Overall, these data support a direct effect of ICN1 on *IL7R* transcription.

Notch receptors can induce gene transcription by two alternative mechanisms either dependent or independent of ICN1 binding to the transcription factor CSL (CBF-1/RBP-J $\kappa$  suppressor of Hairless, and Lag-1) and subsequent recruitment of a coactivation protein complex including p300, CBP, and MAML1 (3). Supporting a CSL-dependent mechanism of Notch1-induced *IL7R* gene activation, we identified a putative CSL-binding site (CTTGGGAA) in the *IL7R* promoter that was conserved between human and mouse at positions -936 and -996 bp upstream of the transcription initiation site, respectively (Fig. 3 A). Formal proof that CSL was in fact involved in ICN1-induced *IL7R* promoter activation was obtained from luciferase reporter assays performed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from RBP-J $\kappa$ <sup>-/-</sup> homozygous mice or RBP-J $\kappa$ <sup>+/-</sup> heterozygous controls (33). We found that ectopic ICN1 expression markedly induced *IL7R* promoter activity in RBP-J $\kappa$ <sup>+/-</sup> MEFs but promoter activation was severely impaired in CSL-deficient RBP-J $\kappa$ <sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 3 D). Moreover, site-directed mutagenesis (CTTGGGAA to CTGTACCA) at the CSL-binding site resulted in impaired transcription from the *IL7R* reporter construct in 293T cells (Fig. 3 E). Therefore, ICN1-induced activity of the *IL7R* promoter is dependent on the CSL-binding site.

To directly test whether ICN1 associates to the CSL-binding motif of *IL7R* in vivo, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using an antibody against human Notch1. DNA fragments spanning the CSL-binding site of the *IL7R* promoter were enriched in ICN1 immunoprecipitates from SupT1 and CUTLL1 T-lineage cell lines, as well as from primary DN2 human thymocytes, but not from REH, NALM-6, and HPB-NUL pre-B cell lines. As a control, we also observed a selective enrichment of the Notch target gene *HES1* in the former cells (Fig. 3 F, top). Therefore, endogenous ICN1 can bind constitutively to the CSL-binding site of *IL7R* and *HES1* promoters in T-lineage cells, although with different efficiencies that may depend on stage-specific differences in chromatin contexts. However, no binding of ICN1 could be detected in any pre-B cell line. Because *IL7R* expression is regulated by the Ets transcription factor PU.1 in developing B cells (21), ChIP assays were performed using an anti-PU.1 antibody as well. In contrast to ICN1, PU.1 bound to the *IL7R* promoter in all analyzed pre-B cell lines but not in pre-T thymocytes or cell lines (Fig. 3 F, bottom). Therefore, ICN1 binds in vivo to the CSL site of the

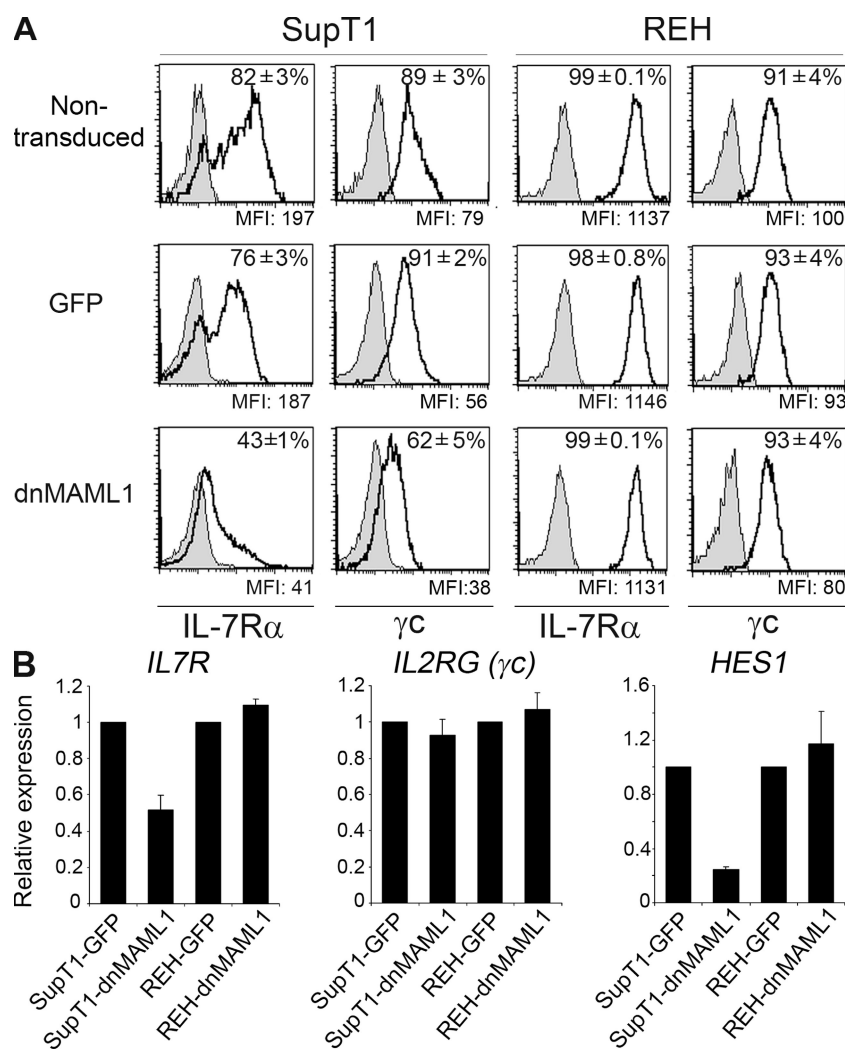
*IL7R* promoter in human pre-T cells, whereas PU.1 associates with the *IL7R* promoter in pre-B cells.

### Notch1 signaling regulates IL-7R $\alpha$ expression and controls progenitor expansion in early human T cell development

Our finding that *IL7R* is a direct transcriptional target of Notch1 pointed to a fundamental role of Notch1 in the regulation of IL-7R $\alpha$  expression during T cell development. In fact, expression and activity of Notch1 measured by *HES1* transcriptional levels paralleled *IL7R* mRNA expression throughout human thymocyte development (Fig. 4). *IL7R* expression also correlated with mRNA levels of its target *BCL2* and with those of the Notch1 target pT $\alpha$  (*PTCRA*). However, expres-

sion of the *SPI.1* gene that encodes PU.1 was inversely correlated with *IL7R* mRNA expression. Also, we did not find correlation between *IL7R* and *GABPA*, the gene encoding the Ets factor GABP $\alpha$ , which was uniformly expressed along T cell development (Fig. 4). Therefore, Notch1 activation, but neither PU.1 nor GABP $\alpha$  expression, correlated with *IL7R* expression along human T cell development.

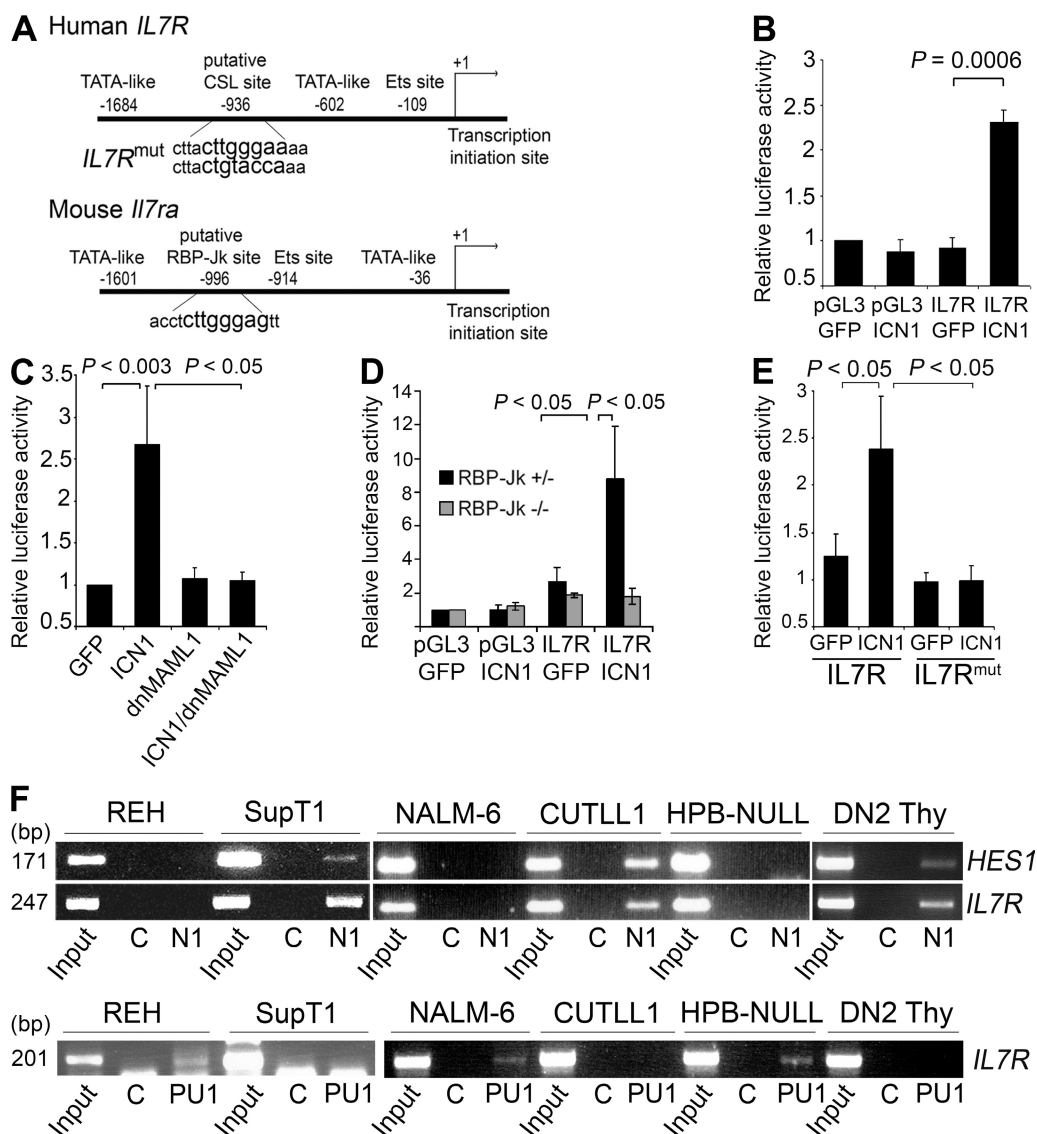
To directly investigate the contribution of Notch1 to the regulation of IL-7R $\alpha$  expression during human thymopoiesis, ETPs from human thymus were transduced with the pan-Notch inhibitor dnMAML1 fused to GFP, and development of thymocytes incapable of Notch signaling was analyzed in an FTOC assay using GFP as a tracer. We found that proportions of



**Figure 2.** Inactivation of Notch signaling by dnMAML1 results in T-lineage-specific inhibition of IL-7R $\alpha$  protein and *IL7R* mRNA expression. SupT1 pre-T cells and REH pre-B cells were transduced either with a retroviral vector encoding dnMAML1 fused to GFP or with a GFP-only control vector. (A) Surface expression of IL-7R $\alpha$  and  $\gamma$ C chains was analyzed by flow cytometry on electronically gated GFP $^{+}$  and dnMAML1 $^{+}$  cells 6 d after transduction or on total nontransduced cells. Shaded histograms represent background staining with an irrelevant isotype-matched antibody. Numbers in quadrants are means  $\pm$  SEM of percentages of positive cells from three independent experiments. MFI data of this particular experiment are shown at the bottom of each histogram. (B) Real-time quantitative PCR analysis of *IL7R* (IL-7R $\alpha$ ), *IL2RG* ( $\gamma$ C), and *HES1* mRNA expression in SupT1 and REH cells transduced with dnMAML1-GFP or GFP only. Results were normalized to *GAPDH* expression values. Bar graphs represent means  $\pm$  SEM of triplicate samples. Results are representative of three independent experiments.

dnMAML1<sup>+</sup> thymocytes decreased markedly with time in FTOC compared with GFP-only-transduced controls (Fig. 5 A). This was likely a result of a growth disadvantage of thymocytes with impaired Notch signaling because absolute numbers of dnMAML1<sup>+</sup> cells remained essentially constant during the first

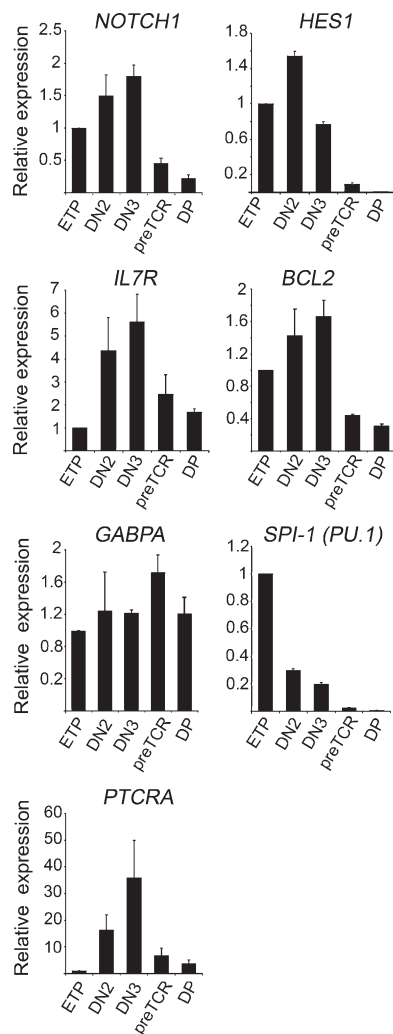
2 wk of FTOC, although they dropped abruptly thereafter and altogether by day 25. In contrast, GFP-transduced controls increased steadily throughout culture (Fig. 5 B). Notably, impaired proliferation of dnMAML1<sup>+</sup> thymocytes consistently correlated with undetectable IL-7R $\alpha$  expression levels on



**Figure 3. CSL/MAML-mediated transcriptional activation of *IL7R* by active Notch1.** (A) Identification of a conserved CSL-binding site in the 5' regulatory region of human *IL7R* and mouse *Il7ra*. Numbers indicate distances in base pairs from the transcription initiation site. (B) Luciferase reporter assays in 293 T cells cotransfected with a reporter construct containing the 5' regulatory region of *IL7R* shown in A, along with either a retroviral vector encoding ICN1 and GFP (ICN1) or a GFP-only control vector (GFP). Data are represented as fold induction over luciferase activity of control cells cotransfected with an empty reporter vector (pGL3B) and the GFP-only vector. (C) MAML-dependent activation of *IL7R* transcription. Reporter assays were performed in Jurkat cells cotransfected with the *IL7R* reporter and ICN1-GFP, and with or without dnMAML1-GFP. Data are represented as fold induction over luciferase activity of control cells transfected with the GFP-only vector. (D and E) Notch-induced *IL7R* promoter activity requires an intact CSL-binding site. Reporter assays were performed in RBP-Jk<sup>+/−</sup> and RBP-Jk<sup>−/−</sup> MEFs cotransfected with the *IL7R* reporter along with either ICN1-GFP or GFP-only vectors (D) and 293 T cells cotransfected with ICN1-GFP along with a reporter vector containing either the wild-type sequence of the CSL-binding site in the *IL7R* promoter or the mutated (mut) CSL sequence shown in A (E). Bar graphs represent means  $\pm$  SEM of triplicate samples from at least four independent experiments. (F) ICN1 binds to the *IL7R* promoter in vivo. Formaldehyde cross-linked chromatin from primary DN2 human thymocytes, SupT1 pre-T cells and CUTLL1 T-lineage cells, and REH, NALM-6, and HPB-NULL pre-B cells was subjected to ChIP with specific antibodies against human Notch1 (N1; top), or PU.1 (bottom). Goat or rabbit Igs were used, respectively, as controls. PCR was done on input DNA and on immunoprecipitated DNA with primers pairs spanning the CSL sites of *HES1* and *IL7R* (top) or the Ets site of *IL7R* (bottom). Results are from one representative out of two to three independent experiments.

~50% of thymocytes before day 12 ( $54.6 \pm 10.1$  and  $51.7 \pm 8.6\%$  by days 4 and 11, respectively; Fig. 5 C) and with reduced numbers of cycling cells (up to 14-fold by day 11; Fig. 5 D). Moreover, those dnMAML1<sup>+</sup> cells that still displayed surface IL-7R $\alpha$  had significantly diminished IL-7R $\alpha$  surface levels as compared with GFP controls (MFI: 12.7 vs. 22.8 and 12.6 vs. 20.0 at days 5 and 11, respectively; Fig. 5 E).

In terms of differentiation, dnMAML1 overexpression resulted in a complete block in the generation of DP CD3<sup>+</sup> thymocytes expressing either the pre-TCR or the TCR- $\alpha\beta$  (Fig. 5, F and G) together with a parallel increase in both DP immature thymocytes lacking CD3 and non-T cells (Fig. 5 F and Fig. S2). This pattern resembles that found in FTOC assays in



**Figure 4. Regulated gene expression in early human T cell development.** Expression of the indicated genes was analyzed by real-time quantitative PCR using specific Taqman probes. Total RNA was isolated from sorted human thymocyte cell subsets representative of successive developmental stages: ETP (CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>), DN2 (CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>), DN3 (CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), pre-TCR (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pre-TCR<sup>+</sup>), and DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup>). Samples were normalized to the expression of 18S ribosomal RNA. Bar graphs represent means  $\pm$  SEM of duplicate samples from at least two independent experiments.

which treatment with a  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI) impaired Notch signaling and hampered cytoplasmic TCR- $\beta$  (TCR- $\beta$ ic) expression (Fig. S2) (34, 35). Thus, we can conclude that CSL/MAML-dependent Notch1 signaling is absolutely required for progression through the  $\beta$ -selection checkpoint in humans, as reported in mice (9). In contrast, ETPs with impaired Notch signaling were capable of progressing along the initial differentiation stages upstream of  $\beta$  selection with relative efficiencies equivalent to those of controls. Indeed, proportions of DN2 and DN3 thymocytes arising during the initial 2 wk were similar in dnMAML1<sup>+</sup> and GFP<sup>+</sup> FTOCs (Fig. 5 F), although absolute numbers were markedly decreased in the former ( $53 \pm 13\%$  [ $P = 0.0164$ ] and  $74 \pm 11\%$  [ $P = 0.002$ ] reduction of control DN3 cells by days 4 and 11, respectively), and essentially no dnMAML1<sup>+</sup> cells were recovered by day 25 (Fig. 5 G). Down-regulated IL-7R levels may thus be sufficient for maintaining survival of thymocytes upstream of  $\beta$  selection but unable to sustain cellular expansion in response to mouse IL-7 produced locally in the thymic lobes. Supporting this possibility, neither numbers of apoptotic cells nor expression levels of antiapoptotic Bcl2 molecules changed significantly in Notch-deprived FTOCs before day 12. However, down-regulated IL-7R $\alpha$  levels expressed on Notch-deprived thymocytes showed a diminished function, as assessed by STAT5 phosphorylation, compared with controls (Fig. S3). Collectively, these data indicated that impaired Notch signaling had two independent stage-specific effects during T cell development: first, a down-regulation of IL-7R $\alpha$  expression that resulted in an impaired proliferation from DN1 to DN3 stages; and second, a developmental arrest at the  $\beta$ -selection checkpoint. We thus concluded that Notch1 signaling has a critical role in sustaining proliferation between T cell specification and commitment, whereas it is thereafter obligatory for  $\beta$  selection.

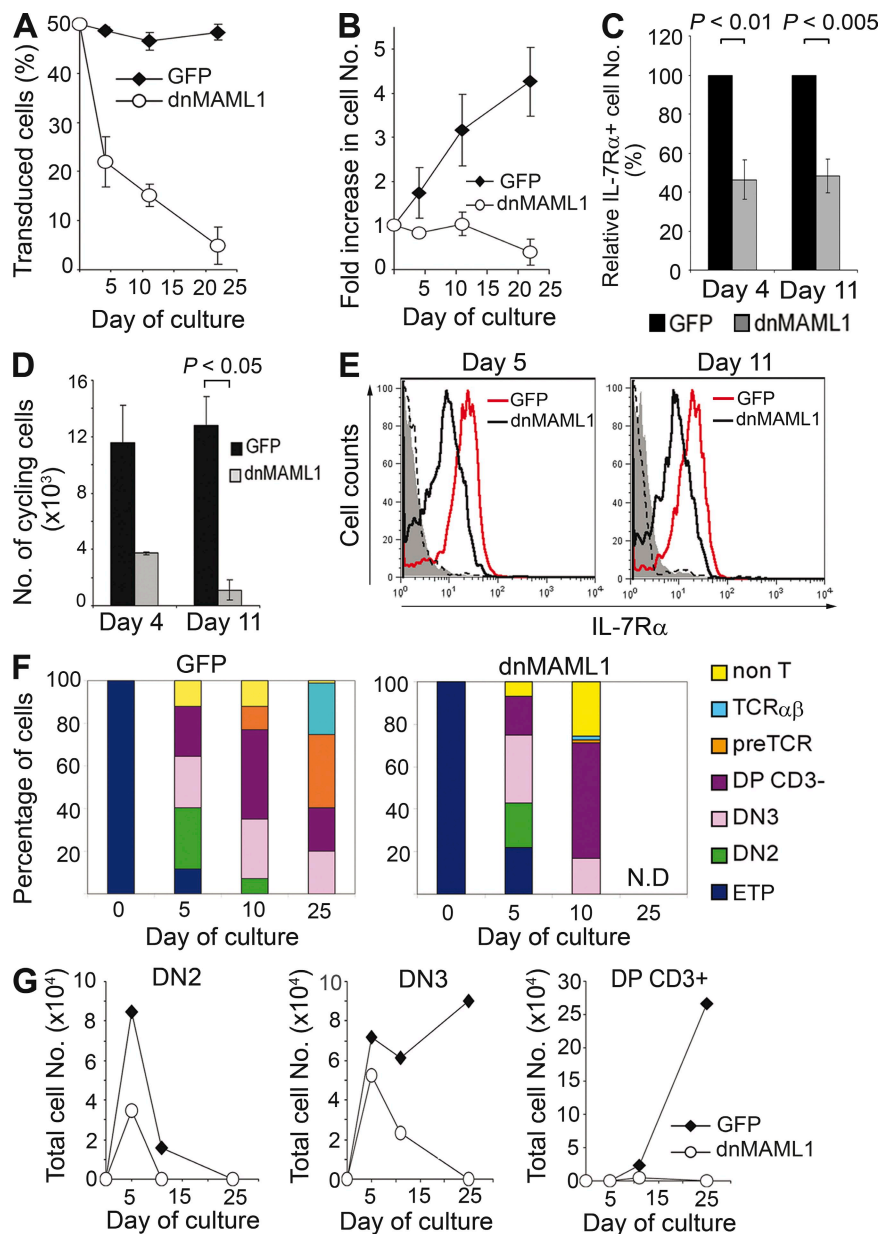
#### Enforced expression of IL-7R $\alpha$ rescues impaired proliferation of DN thymocytes incapable of Notch1 signaling

To investigate whether restoration of IL-7R $\alpha$  expression might be sufficient to rescue defective development of Notch-deprived thymocytes, ETPs were transduced with a retrovirus encoding IL-7R $\alpha$  and GFP, or with a GFP-only vector, and T cell development was then analyzed in an FTOC treated with the GSI compound E (CompE) (36) or in untreated cultures. Because IL-7R $\alpha$  overexpression on DP thymocytes has been shown to disrupt thymopoiesis in mice as a result of an impaired supply of local IL-7 for DN cells (19), hIL-7 was exogenously provided to our FTOC assays. IL-7R $\alpha$  overexpression did not significantly affect IL-7-mediated proliferation of thymocytes with intact Notch signaling, as proportions of GFP- and IL-7R $\alpha$ -transduced thymocytes remained constant throughout culture in GSI-untreated FTOCs (Fig. 6 A). In contrast, proportions of IL-7R $\alpha$ -transduced cells increased significantly over non-transduced thymocytes in GSI-treated lobes during the first 2 wk of culture (Fig. 6 A), indicating that enforced IL-7R $\alpha$  expression provided a competitive growth advantage to early



developing thymocytes with inactive Notch. Accordingly, ectopic IL-7R $\alpha$  expression significantly rescued the reduced cell recovery observed during the initial 2 wk of culture

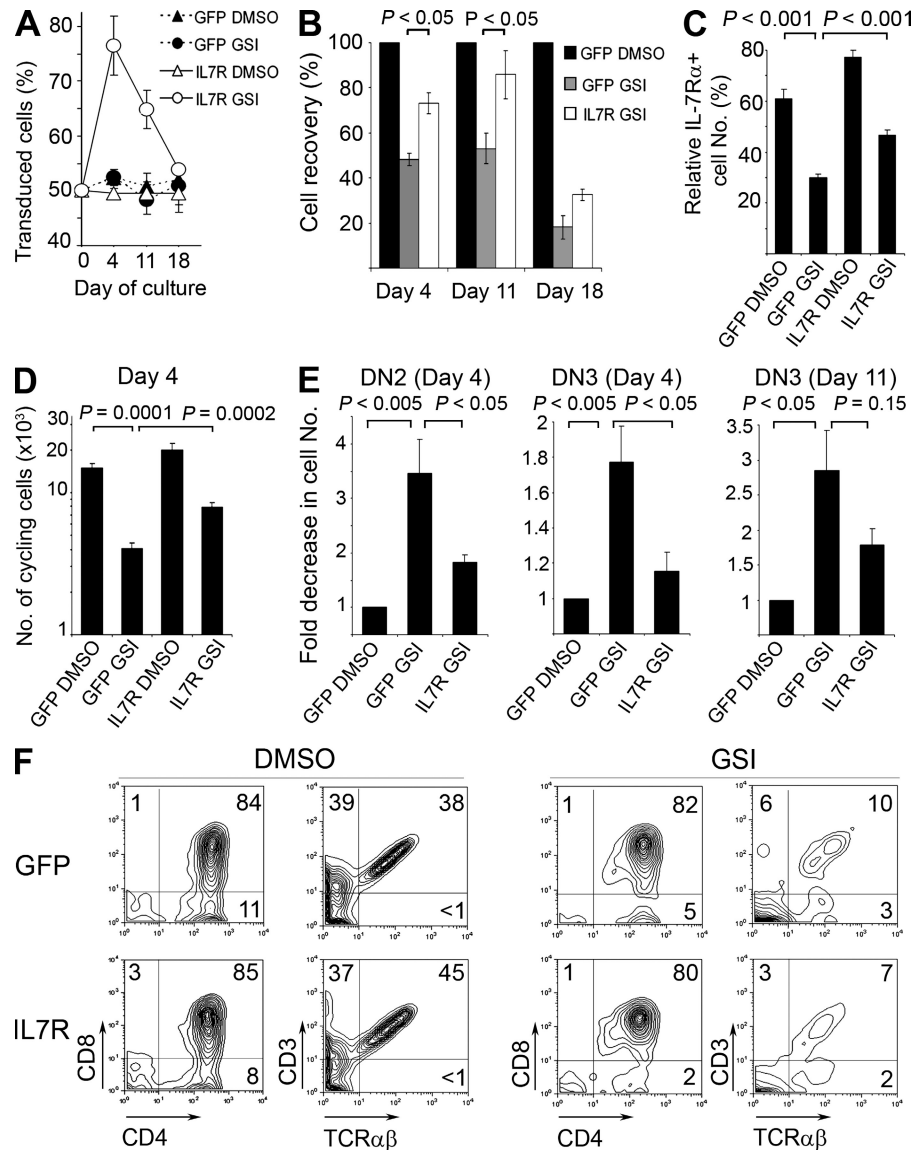
in GSI-treated lobes (Fig. 6 B and Fig. S3). Restored cellularity was associated with increased proportions of IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> thymocytes (Fig. 6 C) and elevated numbers of cycling cells



**Figure 5. Notch inhibition by dnMAML1 down-regulates IL-7R $\alpha$  expression and impairs DN progenitor expansion in early human T cell development.** Human ETPs were retrovirally transduced with dnMAML1-GFP (dnMAML1) or GFP-only (GFP) vectors and cultured in a FTOC assay. (A) Percentages of electronically gated GFP<sup>+</sup>- and dnMAML1<sup>+</sup>-transduced cells recovered at the indicated days were normalized to 50% of transduced cells at day 0. (B) Absolute numbers of GFP<sup>+</sup>- and dnMAML1<sup>+</sup>-transduced thymocytes are represented as fold increase normalized to input cell numbers (10<sup>4</sup>) of transduced cells. (C) Notch inhibition results in reduced numbers of IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> cells in FTOC. Relative numbers of IL-7R $\alpha$ -expressing cells generated by days 4 and 11 of FTOC were determined on electronically gated GFP<sup>+</sup>- and dnMAML1<sup>+</sup>-transduced cells and normalized to 100% expression in GFP-transduced controls. (D) Absolute numbers of cells in S-G2-M phases of cell cycle were determined by DRAQ5 staining on gated GFP<sup>+</sup>- and dnMAML1<sup>+</sup>-transduced cells. Results in A–D are means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. (E) Surface IL-7R $\alpha$  expression levels analyzed by flow cytometry on electronically gated GFP<sup>+</sup> and dnMAML1<sup>+</sup> cell progenies generated by days 5 and 11 of FTOC. Background fluorescence (shaded) was determined with an irrelevant isotype-matched antibody. (F) Percentages of thymocyte cell subsets generated from ETPs were calculated on gated GFP<sup>+</sup>- and dnMAML1<sup>+</sup>-transduced cells at the indicated times of FTOC. Non-T refers to CD13<sup>+</sup> or CD56<sup>+</sup> cells. ND, not determined because of low cell recovery. (G) Total numbers of DN2, DN3, and DP CD3<sup>+</sup> thymocytes generated in F. Results in E–G are representative of at least three independent experiments.

(Fig. 6 D) and with a rescued production of DN2 and DN3 thymocytes (Fig. 6 E). Still, levels of apoptosis or expression of Bcl2 remained unchanged regardless of IL-7R $\alpha$  ectopic expression in GSI-treated lobes (Fig. S3), thus confirming that

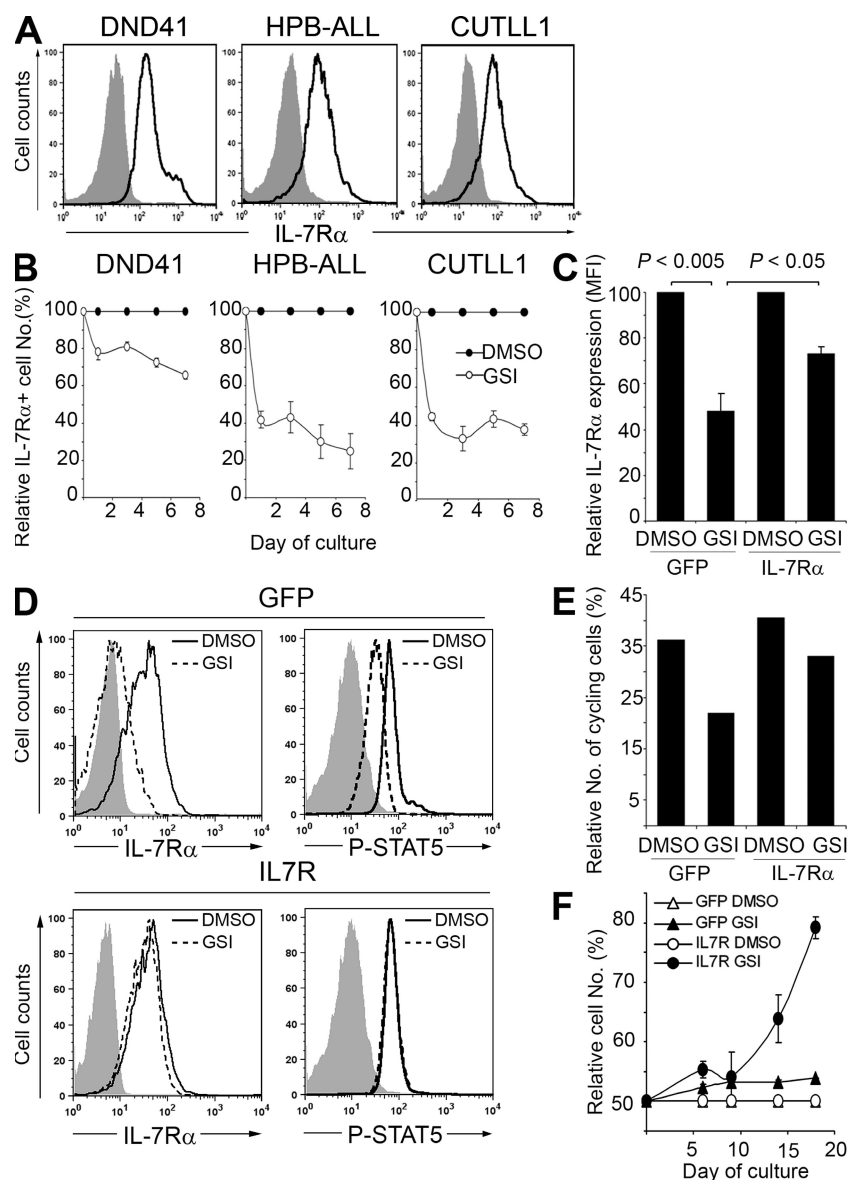
proliferation, rather than survival, is compromised in the absence of Notch signaling before the  $\beta$ -selection checkpoint. Thereafter, however, enforced IL-7R $\alpha$  expression was unable to rescue Notch-deprived thymocytes from GSI-induced



**Figure 6. Ectopic IL-7R $\alpha$  expression rescues defective proliferation of early DN thymocytes incapable of Notch signaling but cannot substitute for Notch at the  $\beta$ -selection checkpoint.** Human ETPs transduced either with a retroviral vector encoding IL-7R $\alpha$  and GFP or with a GFP-only vector were cultured in an FTOC assay supplemented with recombinant human IL-7 and either the GSI CompE or DMSO vehicle. (A) Percentages of electronically gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced cells recovered at the indicated days were normalized to 50% of transduced cells at day 0. (B) Relative cell numbers of electronically gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced cells recovered from GSI-treated FTOCs were normalized to 100% cell recovery of GFP $^{+}$ -transduced control thymocytes in DMSO-treated FTOCs. (C) Percentages of IL-7R $\alpha$ -expressing cells were determined by flow cytometry on electronically gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced cells by day 11 of FTOC. (D) Numbers of cells in S-G2-M phases of cell cycle were determined on gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced cells by day 4. (E) Relative production of DN2 and DN3 thymocytes was determined by flow cytometry on gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced cells at the indicated days of FTOC. Data are represented as fold reduction of absolute numbers of GFP $^{+}$  and dnMAML1 $^{+}$ -transduced thymocytes in GSI-treated FTOCs normalized to numbers of control GFP $^{+}$  cells in DMSO-treated FTOCs. Results in A–E represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. (F) Flow cytometry of CD4 versus CD8 and TCR $\alpha\beta$  versus CD3 expression was performed on gated GFP $^{+}$ - and IL-7R $\alpha^{+}$ -transduced thymocytes by day 19 of FTOC. Numbers in quadrants indicate percentage of positive cells. Total cell recoveries from  $2 \times 10^4$  input cells per lobe were 203,290 and 45,074 GFP $^{+}$  cells in DMSO- and GSI-treated lobes, respectively, and 177,345 and 55,254 IL-7R $\alpha^{+}$  cells in DMSO- and GSI-treated lobes, respectively. Results from one out of three independent experiments are shown.

apoptosis, and absolute cell numbers dropped abruptly along the third week of FTOC (Fig. S3). This effect concurs with a profound developmental block at the  $\beta$ -selection checkpoint, marked by the impaired production of TCR- $\alpha\beta^+$  DP thymocytes (Fig. 6 F) and the aberrant generation of DP CD3 $^-$

thymocytes lacking TCR- $\beta$ ic (Fig. S2). Collectively, these results demonstrate that ectopic expression of IL-7R $\alpha$  can restore proliferation of Notch-deprived thymocytes placed upstream of  $\beta$  selection but cannot substitute for Notch signaling at the  $\beta$ -selection checkpoint.



**Figure 7. Notch1 regulates IL-7R $\alpha$  expression and IL-7-dependent proliferation in T-ALL.** (A) Surface IL-7R $\alpha$  expression analyzed by flow cytometry on DND41, HPBALL, and CUTLL1 T-ALL cell lines. Background fluorescence (shaded) was determined with an irrelevant isotype-matched antibody. (B) Percentages of IL-7R $\alpha$ -expressing T-ALL cells cultured with the GSI CompE were determined by flow cytometry and normalized to 100% IL-7R $\alpha^+$  cells recovered from DMSO-treated controls at the indicated times. (C) Relative IL-7R $\alpha$  expression levels on CUTLL1 cells transduced either with a retrovirus encoding IL-7R $\alpha$  and GFP or with a GFP-only vector were determined by flow cytometry upon culture with either GSI CompE or DMSO for 10 d. MFI values were normalized to IL-7R $\alpha$  expression values on GFP-transduced CUTLL1 cells treated with DMSO. (D) Relative protein level (left) and function (right) of IL-7R $\alpha$  receptors expressed on CUTLL1 cells transduced and cultured as in C were determined by flow cytometry after surface staining of IL-7R $\alpha$  and intracellular staining of phosphorylated STAT5 with specific mAbs. Background fluorescence (shaded) was determined with irrelevant isotype-matched mAbs. (E) Relative numbers of cells in S-G2-M phases of cell cycle from a representative experiment in (C) were determined on gated GFP $^+$ - and IL-7R $\alpha^+$ -transduced CUTLL1 cells by day 18. (F) Percentages of GFP $^+$  and IL-7R $\alpha^+$  CUTLL1 cells transduced and cultured as in C were normalized to 50% of transduced cells at day 0. Data in B, C, and F are means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Results in D and E are from one of three independent experiments performed on different days.

### Notch1 regulates IL-7R $\alpha$ expression and IL-7-dependent proliferation in T cell leukemias

Similar to normal immature thymocytes, leukemic blasts from T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) patients can express functional IL-7Rs that support proliferation in response to IL-7 (37). Because gain-of-function mutations in Notch1 are common in T-ALL (38), we decided to investigate whether Notch signaling also controls IL-7R $\alpha$  expression in T-ALLs. To this end, we analyzed the ability of CompE to inhibit IL-7R $\alpha$  expression in three GSI-sensitive T-ALL cell lines (DND41, HPB-ALL, and CUTLL1) that display constitutive IL-7R $\alpha$  expression (Fig. 7 A). As previously described (36), CompE treatment resulted in Notch1 inhibition and impaired proliferation of T-ALLs (Fig. S4). Notably, these effects paralleled a gradual down-regulation of IL-7R $\alpha$  expression, which resulted in an up to 70% reduction of cells expressing IL-7R $\alpha$  during the first week of treatment (Fig. 7 B). Similar results were obtained using additional T cell lines including SupT1 (Fig. 2), Jurkat (Fig. S1), and Peer (not depicted). Therefore, Notch signaling controls IL-7R $\alpha$  expression in T-ALLs.

To assess whether IL-7R $\alpha$  expression is relevant to T-ALL proliferation independently of Notch, we analyzed responsiveness to IL-7 of GSI-treated CUTLL1 cells transduced with *IL7R*. As shown in Fig. 7 C, *IL7R* transduction significantly restored surface IL-7R $\alpha$  expression to levels sufficient to rescue diminished STAT5 phosphorylation of GSI-treated T-ALLs (Fig. 7 D) and to support IL-7-induced proliferation, as indicated by the increased proportions of cycling cells (Fig. 7 E). Moreover, ectopic IL-7R $\alpha$  expression provided a competitive growth advantage to T-ALL cells with impaired Notch signaling in response to IL-7, as proportions of IL-7R $\alpha$ -transduced cells increased significantly over nontransduced cells throughout culture, as compared with GFP-transduced controls (Fig. 7 F). Collectively, these results demonstrate that the regulation of IL-7R $\alpha$  expression downstream of Notch1 is not restricted to normal developing thymocytes but is also common to human T-ALL cells. Moreover, they indicate that IL-7R signaling is important for proliferation of Notch-dependent T-ALL cells, suggesting that cooperation between Notch1 and the IL-7R pathway may play a fundamental role in the pathophysiology of T-ALLs.

### DISCUSSION

Notch1 and IL-7R signaling are both critical in early T cell development (27), but a functional relationship between both pathways has not been established. Supporting such a direct link, in this paper we identified IL-7R $\alpha$  as a new transcriptional Notch1 target and showed that IL-7R $\alpha$  expression is regulated by Notch1 in a T-lineage- and developmental stage-specific manner. We also provided evidence that developmental regulation of IL-7R $\alpha$  expression by Notch1 during human thymopoiesis is critical to controlling expansion of the early T cell progenitor compartment in response to IL-7. Moreover, we found that active Notch1 also regulated IL-7R $\alpha$  expression and IL-7-dependent proliferation of human T-ALLs, suggesting that cross talk of both pathways may be relevant for leukemogenesis.

Active Notch1 was shown to specifically transactivate the *IL7R* promoter in a CSL/MAML-dependent manner. This finding provides the molecular basis for understanding the differential transcriptional regulation of *IL7R* expression in T and B cell lineages and offers new insights into the dynamic regulation of IL-7R $\alpha$  expression during thymopoiesis. In mouse B cell development, IL-7R $\alpha$  expression is regulated by two Ets transcription factors, PU.1 and GABP, which appear to function sequentially in a developmental stage-specific manner (21, 24, 25). PU.1 is required as well for survival of early thymic immigrants, but PU.1 down-regulation is obligatory for T cell specification and progression in the T cell lineage (22). We show in this paper that PU.1 down-regulation concurs with up-regulation of Notch activity in human thymopoiesis, as shown in mice (20), and restriction of PU.1 function by Notch1 appears to be a particular aspect of T-lineage specification in mice (39). It is thus possible that IL-7R $\alpha$  expression is initially supported by PU.1 in early thymic immigrants but needs to be maintained after T-lineage specification by Notch1. Alternatively, *IL7R* transactivation in the thymus may be specifically induced only after T cell specification downstream of Notch1 because the earliest thymus precursors still lack IL-7R $\alpha$  (5, 27). Supporting a direct role of Notch1 in *IL7R* transcription de novo, we showed that induction of IL-7R $\alpha$  expression in CB multipotent progenitors was critically regulated by Notch1 signaling. In any of these scenarios, factors other than Notch1 may contribute to sustain IL-7R expression in more mature T cell-committed thymocytes, as Notch1 activity is drastically down-regulated in post- $\beta$ -selected thymocytes before transition to the DP stage. In this regard, Xue et al. (23) have shown that GABP regulates *IL7R* expression in mouse developing thymocytes and that it is required for a normal DN to DP transition after  $\beta$  selection (24). Because *GABPA* mRNA expression is maintained at high levels throughout human thymopoiesis, and particularly in pre-TCR<sup>+</sup> and DP thymocytes with down-regulated Notch (Fig. 4), it is possible that GABP is actually contributing to *IL7R* gene expression in  $\beta$ -selected thymocytes also in humans. Thus, GABP could act in concert with lineage-specific *IL7R* regulators to control stage-specific *IL7R* expression in human thymopoiesis, as occurs during B cell development in mice (24, 25).

Defective proliferation of Notch-deprived thymocytes in our FTOC assays could be rescued by enforced expression of IL-7R $\alpha$ . This was a stage-specific effect restricted to thymocytes within the early DN progenitor compartment, but IL-7R $\alpha$  failed to replace Notch1 signals at the  $\beta$ -selection checkpoint, when cell survival requires a proper pre-TCR function (8). Therefore, crucial checkpoints controlling cellular expansion in human thymopoiesis are independently set by the signaling functions of the IL-7R and the pre-TCR, as proposed in mice (40), and both seem highly dependent on Notch1 activity. Indeed, we show in this paper that Notch1 controls IL-7R-dependent proliferation of the DN progenitor pool, and Maillard et al. (41) recently demonstrated an absolute requirement of Notch for cell survival/proliferation during  $\beta$  selection in vivo that was independent of the pre-TCR, as was



previously shown *in vitro* (9). Thus, Notch and pre-TCR should act in parallel pathways that synergize during  $\beta$  selection (41). Still, TCR- $\beta$  rearrangement and/or expression could be Notch dependent because DN4-like thymocytes lacking TCR- $\beta$ ic accumulated in Notch1-deficient mice (42) as well as in our dnMAML1<sup>+</sup> and GSI-treated FTOCs. Collectively, we can propose that, besides the conventional roles reported for Notch1 as a commitment factor very early in thymopoiesis and as a trophic factor during  $\beta$  selection, Notch1 serves a more unconventional role as a regulator of IL-7 responsiveness and T cell progenitor expansion before acquisition of the pre-TCR. Thus, the two main phases of cellular growth characterized in postnatal thymic lymphopoiesis, involving either the IL-7R or the pre-TCR, are independently impacted by Notch1 signals.

Our gene expression analyses support the idea that the exquisite stage-specific dependence of IL-7 during thymopoiesis is the result of the coordinated regulation of Notch1 activity and IL-7R $\alpha$  expression, and a similar mechanism can be inferred from available data in mice (6, 20). We found that Notch target genes and *IL7R* simultaneously reached maximal expression at the DN2 and DN3 stages, and both became down-regulated before transition to the DP stage. Accordingly, maximal IL-7 responsiveness and massive expansion occurs *in vivo* at the DN2 to DN3 transition (10, 11, 13), whereas developing thymocytes become insensitive to IL-7 between the  $\beta$ -selection and positive selection checkpoints (18). Besides transcriptional regulation, active suppression of cytokine signal transduction ensures termination of IL-7R signals required for progression to the DP stage in mice, and then IL-7R $\alpha$  expression and signaling are restored by positive selection (17). Such a strict control may be necessary to avoid IL-7-mediated survival/proliferation signals in preselection DP thymocytes and to escape from overactivity of a cytokine receptor, which can contribute to thymocyte malignancy (43). Our observation that ectopic IL-7R $\alpha$  could rescue the growth arrest induced by Notch deprivation not only in normal thymocytes but also in T-ALLs is, thus, remarkable. Importantly, IL-7R signaling significantly contributes to T-ALL proliferation by activation of PI3K (37), and constitutive PI3K activation has recently been shown to induce resistance to Notch1 inhibition in T-ALL (36). Therefore, downstream effectors of IL-7R, such as PI3K, represent suitable molecular targets for therapeutic intervention. Overall, these results implicate IL-7R $\alpha$  as a major regulator for cell cycle progression induced by Notch1 in early human thymopoiesis and support a cooperative role between Notch1 and IL-7R $\alpha$  in leukemogenesis that deserves further studies.

It is currently believed that dynamic regulation of IL-7R $\alpha$  expression determines efficient responses to limited amounts of IL-7 locally supplied by the thymic microenvironment (19). In mice made transgenic for Lunatic Fringe, a modulator of Notch activation, DN thymocytes must continuously compete for limiting Notch1 expansion signals *in vivo* (44). We can thus propose that by regulating lineage- and stage-specific expression of IL-7R $\alpha$ , Notch could serve a crucial role devoted to enhancing competitiveness for limiting IL-7 production in the

thymus and also in the bone marrow niches, which would finally result in selective expansion of ETPs and leukemic blasts under physiological and pathological conditions, respectively.

## MATERIALS AND METHODS

**Thymus and CB precursor isolation and flow cytometry.** Experiments were performed, and thymus and CB samples were obtained, in accordance with procedures approved by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Bioethics Committee. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. ETPs, DN2, and DN3 thymic progenitors were isolated using the Dynal CD34 selection system (Invitrogen) in combination with cell sorting using a FACS Vantage SE (BD). DP subsets (CD3<sup>+</sup> TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> pre-TCR<sup>+</sup>) and CB CD34<sup>+</sup> progenitors were selected using Percoll density gradients (Thermo Fisher Scientific) and magnetic cell sorting (AutoMACS; Miltenyi Biotec) as previously described (35).

Antibodies used were the following: CD1a-PE, CD4-PE-Cy5, CD13-PE-Cy5, CD33-PE-Cy5, CD34-PE-Cy5, CD56-PE-Cy5, IL-7R $\alpha$ -PE, and TCR- $\alpha\beta$ -PE-Cy5 (Beckman Coulter); CD3-PE,  $\gamma$ c-biotin, CD34-FITC, Bcl2-PE, IL-7R $\alpha$ , and goat anti-mouse IgG $\alpha$ -APC (BD); and CD8-PE (Invitrogen). TCR- $\beta$ ic expression was assessed using the Cytofix Cytoperm kit (BD) and the  $\beta$ F1 mAb (provided by M. Brenner, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA). Intracellular expression of pSTAT5 was assessed after paraformaldehyde/methanol fixation and pSTAT5-Alexa Fluor 647 staining according to the manufacturer's instructions (BD). DRAQ5 (Enzo Biochem, Inc.) was used for cell cycle analysis. Staining with biotin-coupled Annexin V (Roche) plus Streptavidin-PE (Invitrogen) and 7-AAD (BD) was used for apoptosis analysis. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur (BD). Irrelevant isotype-matched antibodies (Invitrogen) were used as controls.

**Retrovirus constructs and retroviral infections.** Retrovirus vectors encoding the ICN1 Notch1 domain and GFP from a bicistronic transcript (MigR1-ICN1), GFP alone (MigR1-GFP) (26), and the dnMAML1 fused to GFP (MigR1-dnMAML1) (32) were provided by J.C. Aster (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA). Full-length human IL-7R $\alpha$  complementary DNA was cloned into the EcoRI site of MigR1-GFP. Viral supernatant production and retroviral infections were performed as previously described (35). Phoenix (Ampho) packaging cells were provided by G. Nolan (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA) and H. Spits (University of Amsterdam Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands).

**FTOC assays and cell cultures.** FTOC assays were performed as previously described (34). In brief, thymic lobes from 14.5-d-old Swiss mouse embryos were treated with deoxyguanosine (d-Guo; Sigma-Aldrich) and cocultured with transduced human ETPs ( $1\text{--}2 \times 10^4$  cells/lobe). For inhibition of Notch1 signaling, the GSI CompE (Enzo Biochem, Inc.) was added to FTOCs at a final concentration of 100 nM. DMSO vehicle was used as control. When indicated, FTOCs were supplemented with 200 IU/ml of recombinant human IL-7 (National Institute of Biochemical Standards and Controls). Animal procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee.

Human ETPs and CB CD34<sup>+</sup> progenitors transduced with either ICN1-GFP or GFP-only vectors were cultured with multilineage-supportive cytokines as previously described (27). GFP- and dnMAML1-transduced CD34<sup>+</sup> CB cells were cocultured with OP9-DL1 stroma as reported (29). T-lineage cell lines (Jurkat, CUTLL1, HPB-ALL, and SupT1) and pre-B cell lines (REH, NALM6 [both provided by A. de la Hera and E. Sanz, University of Alcalá, Madrid, Spain], and HPB-NUL) [provided by W. Schamel, Max Planck Institute for Immunobiology, University of Freiburg, Freiburg, Germany] were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% FCS.

**Quantitative PCR.** Real-time PCR quantification of complementary DNA synthesized from TRIzol-extracted (Invitrogen) total RNA using oligo (dT) primers (Roche) was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions, in a ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems).

**Luciferase reporter constructs and luciferase assays.** A 2-kb fragment encoding the 5' upstream regulatory region of human *IL7R* (NM\_002185) was amplified by PCR using the Pfu Turbo polymerase system (Agilent Technologies) and cloned in the KpnI and XhoI sites of pGL3Basic luciferase reporter vector (Promega). Site-directed mutagenesis in the CSL-binding site was performed using specific primers (Table S1) and conventional PCR techniques.

For luciferase reporter assays, Jurkat cells were cotransfected by electroporation with the *IL7R* luciferase reporter vector and MigR1-GFP, MigR1-ICN1, and/or MigR1-dnMAML1 plus the constitutively active *Renilla reniformis* luciferase-producing vector pRL-CMV (Promega). 293T cells and RBP-Jk<sup>+/−</sup> or RBP-Jk<sup>−/−</sup> MEFs (33) were cotransfected by calcium phosphate or by lipofection (Lipofectamine Reagent; Invitrogen), respectively, with the *IL7R* luciferase reporter vector and MigR1-GFP or MigR1-ICN1, plus the pRL-CMV *Renilla* vector. Firefly and *Renilla reniformis* luciferase activities were determined in triplicates using the Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega) in a Berthold Sirius luminometer and expressed as fold induction relative to transfection with control plasmids.

**ChIP.** Cells were fixed with 1% paraformaldehyde at room temperature for 15 min. The reaction was stopped by adding glycine up to 0.125 M, and cells were washed in PBS and lysed with SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris HCl, and protease inhibitor cocktail [Roche]). Lysates were sonicated and diluted 10-fold with ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris HCl, 167 mM NaCl, and protease inhibitors). Polyclonal antibodies against either the C-terminal domain of Notch1 or PU.1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were used to label Notch-DNA or PU.1-DNA complexes. Goat or rabbit antibodies were used, respectively, as controls. Immune complexes were precipitated with protein A-agarose and eluted with 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> and 1% SDS. DNA was extracted using phenol/chloroform after treatment with 20 µg/ml of proteinase K. Unbound chromatin (input) and immunoprecipitated DNA samples were analyzed by semiquantitative PCR with primers amplifying the CSL-binding site either of *HES1* or *IL7R* promoters or the PU.1-binding site (Table S1).

**Statistics.** Statistical significance was determined with the two-tailed Student's *t* test, with the  $\alpha$  level set at 0.05.

**Online supplemental material.** Fig. S1 shows the specific regulation of *IL7R* gene expression by Notch1 in T-lineage, but not B-lineage, cell lines, and the analysis of constitutive expression of active Notch1 in SupT1 pre-T cells. Fig. S2 shows that inhibition of Notch signaling results in the specific blockade of human intrathymic T cell development at the  $\beta$ -selection checkpoint. Fig. S3 shows that ectopic expression of IL-7R $\alpha$  rescues impaired proliferation of Notch-deprived thymocyte progenitors placed upstream of  $\beta$  selection but it cannot substitute for Notch signaling at the  $\beta$ -selection checkpoint. Fig. S4 shows the inhibition of Notch1 activation and the impaired proliferation of T-ALL cells treated with the GSI CompE. Table S1 shows the oligonucleotide primers used for RT-PCR, CSL-binding site-directed mutagenesis, and ChIP assays. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20081922/DC1>.

We thank Drs. J.C. Aster for retroviral vectors, G. Nolan and H. Spits for Phoenix cells, A. de la Hera, E. Sanz, and W. Schamel for pre-B cell lines, M. Brenner for  $\beta$ F1 mAb, and Y. Revilla (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain) for helpful discussions, J. Alcain (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain) for technical support, and the Pediatric Cardiosurgery Units from Centro Especial Ramón y Cajal and Ciudad Sanitaria La Paz (Madrid, Spain) for the thymus samples.

This work was supported by grants from Plan Nacional (SAF2004-01122 and BFU 2007-60990), Comunidad de Madrid (S-SAL0304-2006), Fundación la Caixa (ON03/109-00), Fundación MM, and Instituto de Salud Carlos III (RECAVA RD06/0014/1012 and RD06/0014/0038 to M.L. Toribio and J.L. de la Pompa, respectively), and by an Institutional Grant from the Fundación Ramón Areces. S. González-García was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN; FPI program), M. García-Peydró by CSIC (I3P program), and E. Martín-Gayo by MICINN (FPU program) and by CAM.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 27 August 2008

Accepted: 12 March 2009

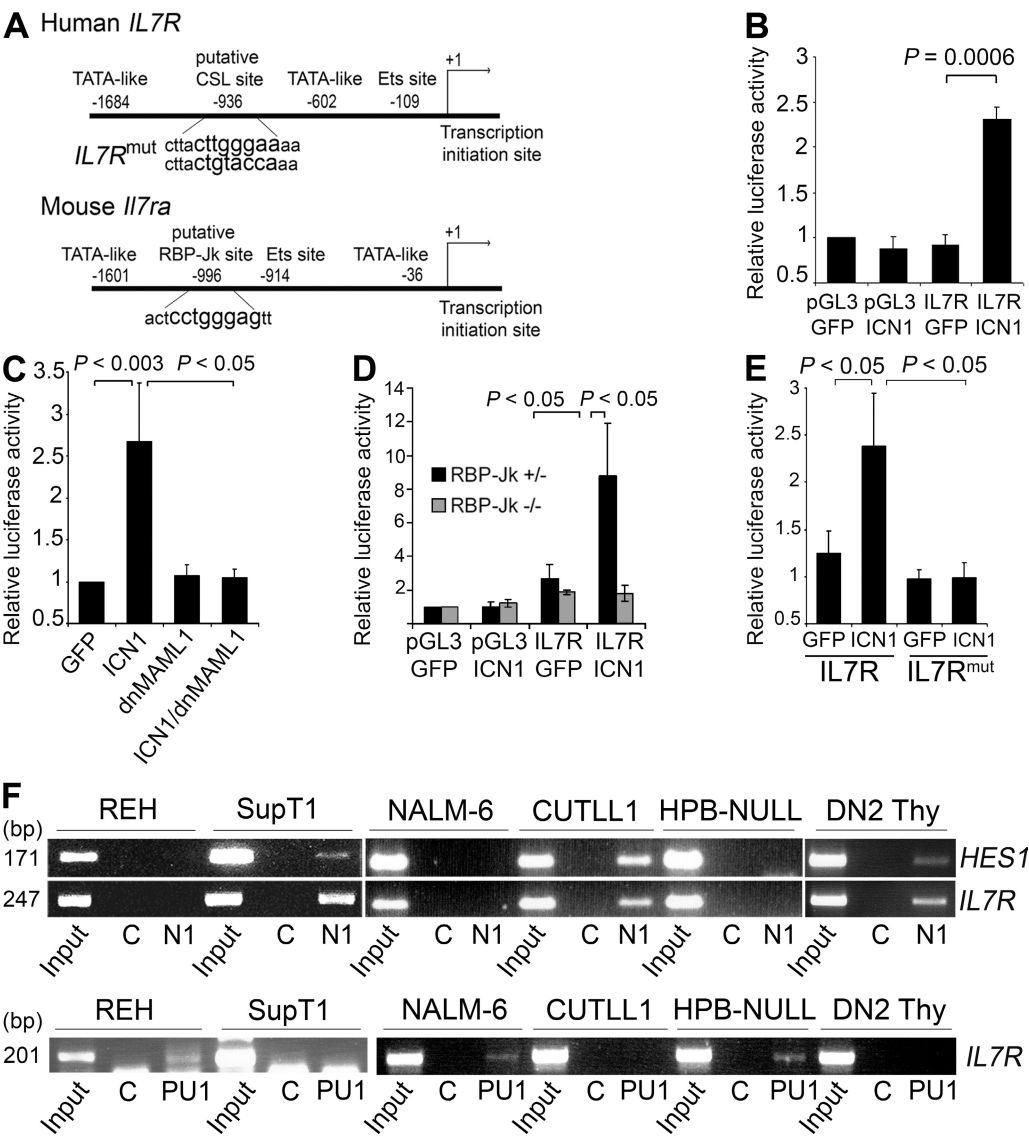
## REFERENCES

- Ciofani, M., and J.C. Zúñiga-Pflücker. 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:463–493.
- Bhandoola, A., and A. Sambandam. 2006. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat. Rev. Immunol.* 6:117–126.
- Maillard, I., T. Fang, and W.S. Pear. 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation and function by the Notch pathway. *Annu. Rev. Immunol.* 23:945–974.
- Schmitt, T.M., M. Ciofani, H.T. Petrie, and J.C. Zúñiga-Pflücker. 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor–ligand interactions. *J. Exp. Med.* 200:469–479.
- Sambandam, A., I. Maillard, V.P. Zediak, L. Xu, R.M. Gerstein, J.C. Aster, W.S. Pear, and A. Bhandoola. 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat. Immunol.* 6:663–670.
- Tan, J.B., I. Visan, J.S. Yuanand, and C.J. Guidos. 2005. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat. Immunol.* 6:671–679.
- Blom, B., and H. Spits. 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24:287–320.
- von Boehmer, H., and H.J. Fehling. 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15:433–452.
- Ciofani, M., T.M. Schmitt, A. Ciofani, A.M. Michie, N. Cuburu, A. Aublin, J.L. Maryanski, and J.C. Zúñiga-Pflücker. 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 172:5230–5239.
- Shortman, K., M. Egerton, G.J. Spangrude, and R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 2:3–12.
- Sudo, T., S. Nihiskawa, N. Ohno, N. Akiyama, M. Tamakoshi, H. Yoshida, and S. Nishikawa. 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9125–9129.
- Leonard, W.J. 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1:200–208.
- Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180:1955–1960.
- Plum, J., M. De Smedt, G. Leclercq, B. Verhasselt, and B. Vandekerckhove. 1996. Interleukin 7 is a critical growth factor in early human T cell development. *Blood.* 88:4239–4245.
- von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard, and R. Murray. 1997. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity.* 7:147–154.
- Puel, A., S.F. Ziegler, R.H. Buckley, and W.J. Leonard. 1998. Defective IL7R expression in T(–)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* 20:394–397.
- Yu, Q., J.H. Park, L.L. Doan, B. Erman, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2006. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J. Exp. Med.* 203:165–175.
- Van De Wiele, C.J., J.H. Marino, B.W. Murray, S.S. Vo, M.E. Whetsell, and T.K. Teague. 2004. Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are not responsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J. Immunol.* 172:4235–4244.
- Munitic, I., J.A. Williams, Y. Yang, B. Dong, P.J. Lucas, N. El Kassab, R.E. Gress, and J.D. Ashwell. 2004. Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood.* 104:4165–4172.
- Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental program. *Nat. Rev. Immunol.* 8:9–21.
- DeKoter, R.P., H.J. Lee, and H. Singh. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity.* 16:297–309.
- Anderson, M.K., A.H. Weiss, G. Hernández-Hoyos, Ch.J. Dionne, and E.V. Rothenberg. 2002. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity.* 16:285–296.

23. Xue, H.H., J. Bollenbacher, V. Rovella, R. Tripuranemi, Y.B. Du, C.Y. Liu, A. Williams, J.P. McCoy, and W.J. Leonard. 2004. GA binding protein regulates interleukin 7 receptor  $\alpha$ -chain gene expression in T cells. *Nat. Immunol.* 5:1036–1044.
24. Xue, H.H., J. Bollenbacher-Reilly, Z. Wu, R. Spolski, X. Jing, Y.C. Zhang, J.P. McCoy, and W.J. Leonard. 2007. The transcription factor GABP is a critical regulator of B lymphocyte development. *Immunity*. 26:421–431.
25. DeKoter, R.P., B.L. Schweitzer, M.B. Kamath, D. Jones, H. Tagoh, C. Bonifer, D.A. Hildeman, and K.J. Huang. 2007. Regulation of the interleukin-7 receptor  $\alpha$  promoter by the Ets transcription factor PU.1 and GA-binding protein in developing B cells. *J. Biol. Chem.* 282:14194–14204.
26. Aster, J.C., L. Xu, F.G. Karnell, V. Patriub, J.C. Pui, and W.S. Pear. 2000. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by Notch1. *Mol. Cell. Biol.* 20:7505–7515.
27. García-Peydró, M., V.G. de Yébenes, and M.L. Toribio. 2006. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J. Immunol.* 177:3711–3720.
28. Weng, A.P., Y. Nam, M.S. Wolfe, W.S. Pear, J.D. Griffin, S.C. Blacklow, and J.C. Aster. 2003. Growth suppression of pre-T lymphoblastic leukaemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23:655–664.
29. La Motte-Mohs, R.N., E. Herer, and J.C. Zúñiga-Pflücker. 2005. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood*. 105:1431–1439.
30. Reynolds, T.C., S.D. Smith, and J. Sklar. 1987. Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 50:107–117.
31. Carrasco, Y.R., A.R. Ramiro, C. Trigueros, V.G. de Yébenes, M. García-Peydró, and M.L. Toribio. 2001. An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR)  $\alpha$  chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J. Exp. Med.* 193:1045–1057.
32. Minowada, J., H. Koshida, K. Sagawa, I. Kubonishi, M.S. Lok, E. Tatsumi, T. Han, B.I. Srivastava, and T. Ohnuma. 1981. Marker profiles of human leukemia and lymphoma cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 101:91–100.
33. Robert-Moreno, A., L. Espinosa, J.L. de la Pompa, and A. Bigas. 2005. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*. 132:1117–1126.
34. De Smedt, M., I. Hoebeke, K. Reynvoet, G. Leclercq, and J. Plum. 2005. Different thresholds of Notch signaling biases human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic- or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood*. 106:3498–3506.
35. García-Peydró, M., V.G. de Yébenes, and M.L. Toribio. 2003. Sustained Notch1 signaling instructs the earliest human intrathymic precursors to adopt a gammadelta T-cell fate in fetal thymus organ culture. *Blood*. 102:2444–2451.
36. Palomero, T., M.L. Sulis, M. Cortina, P.J. Real, K. Barnes, M. Ciofani, E. Caparros, J. Buteau, K. Brown, S.L. Perkins, et al. 2007. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukaemia. *Nat. Med.* 13:1203–1210.
37. Dibirdik, I., M.C. Langlie, J.A. Ledbetter, L. Tuel-Ahlgren, V. Obuz, K.G. Waddick, K. Gajl-Peczalska, G.L. Schieven, and F.M. Uckun. 1991. Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells. *Blood*. 78:564–570.
38. Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P. Morris 4th., L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, and J.C. Aster. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Science*. 306:269–271.
39. Franco, C.B., D.D. Scripture-Adams, I. Proekt, T. Taghon, A.H. Weiss, M.A. Yui, S.L. Adams, R.A. Diamond, and E.V. Rothenberg. 2006. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103:11993–11998.
40. Di Santo, J.P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H.J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, and B. Rocha. 1999. The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early  $\alpha/\beta$  T cell development. *J. Exp. Med.* 189:563–574.
41. Maillard, I., L. Tu, A. Sambandam, Y. Yashiro-Ohtani, J. Millholland, K. Keeshan, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola, and W.S. Pear. 2006. The requirement for Notch signaling at the  $\beta$ -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J. Exp. Med.* 203:2239–2245.
42. Wolfer, A., A. Wilson, M. Nemir, H.R. MacDonald, and F. Radtke. 2002. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta lineage thymocytes. *Immunity*. 16:869–879.
43. Laouar, Y., I.N. Crispe, and R.A. Flavell. 2004. Overexpression of IL-7R $\alpha$  provides a competitive advantage during early T-cell development. *Blood*. 103:1985–1994.
44. Visan, I., J.B. Tan, J.S. Yuan, J.A. Harper, U. Koch, and C.J. Guidos. 2006. Regulation of T lymphopoiesis by Notch1 and Lunatic fringe-mediated competition for intrathymic niches. *Nat. Immunol.* 7:634–642.

CSL–MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage–specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia  
Sara González-García, Marina García-Peydró, Enrique Martín-Gayo, Esteban Ballestar, Manel Esteller, Rafael Bornstein, José Luis de la Pompa, Adolfo A. Ferrando, and María L. Toribio  
Vol. 206, No. 4, April 13, 2009. Pages 779–791.

The authors regret that a typographical error appeared in Fig. 3 A regarding a putative RBP-Jk binding site located at –996 bp in the mouse *Il7ra* gene promoter. The correct sequence is as follows: actcctgggagtt. The corrected figure appears below.





# Notch 1 signalling in human T-cell development and leukemia

Sara González-García, María L Toribio

*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),  
Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain.*

## LA SEÑALIZACIÓN POR NOTCH1 EN EL DESARROLLO DE CÉLULAS T HUMANAS Y LEUCEMIAS

Recibido: 6 Diciembre 2009

Aceptado: 10 Diciembre 2009

### RESUMEN

Los receptores Notch regulan diferentes aspectos del desarrollo de los metazoos y de la renovación tisular, que incluyen decisiones binarias de destino celular, supervivencia, proliferación o diferenciación, en diferentes tipos celulares y tejidos y en diferentes contextos celulares. En hematopoyesis, la señalización por Notch contribuye activamente al desarrollo de los linfocitos T, induciendo un programa madurativo específico en los progenitores que llegan al timo procedentes de las células madre hematopoyéticas (HSC) de la médula ósea y bloqueando, simultáneamente, la generación de linajes celulares alternativos. Conforme a esta importante función, la desregulación de la señalización por Notch tiene consecuencias críticas para la supervivencia y proliferación de las células T y contribuye significativamente a la generación de la leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL). Por tanto, el estudio de las vías moleculares inducidas por Notch que determinan la maduración de los progenitores T, así como su transformación oncogénica durante el desarrollo intratímico, constituye una importante área de investigación en la actualidad. Se ha demostrado la participación de varios genes y rutas de señalización, tales como c-myc, NF-κB y PI3K, en la oncogénesis de las células T inducida por Notch y más recientemente se ha sugerido la implicación del receptor de la interleucina 7 (IL-7R) en el proceso. En esta revisión discutiremos recientes estudios moleculares que revelan cómo Notch determina la generación de linfocitos T a partir de los inmigrantes intratímicos y cómo su desregulación puede contribuir a la generación de leucemias T-ALL, en parte debido a la regulación directa de la expresión del IL-7R.

**PALABRAS CLAVE:** Hematopoyesis / Células T / Notch1 / IL-7R / Leucemia / Timo.

### ABSTRACT

Notch receptors regulate many aspects of metazoan development and tissue renewal, such as binary cell-fate decisions, survival, proliferation and differentiation, in different cell types and in a context dependent manner. In hematopoiesis, Notch signalling actively contributes to T-cell development by driving hematopoietic stem cell- (HSC-) derived progenitors seeding the thymus into the T-cell lineage, while simultaneously avoiding alternative cell fates. According to this critical role, deregulated Notch signalling has important consequences in T-cell generation, survival and proliferation during thymopoiesis, and significantly contributes to the generation of T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL). Therefore, understanding Notch-dependent molecular pathways that control physiological and pathological development of T-cell progenitors within the thymus has become an intensive area of research in recent years. Several genes and signalling cascades, including c-myc, NF-κB and PI3K, have been identified as critical targets involved in Notch-induced T-cell oncogenesis, and others such as interleukin-7 receptor (IL-7R) have recently been suggested to participate in the process. In this review, we highlight recent studies on Notch that reveal new molecular details about how Notch signalling guides human thymic immigrants along the T-cell lineage and how deregulated activation of Notch can contribute to T cell leukemogenesis, in part by directly regulating expression of the IL-7R.

**KEY WORDS:** Hematopoiesis / T-cell / Notch1 / IL-7R / Leukemia / Thymus.

Published in final edited form as:

*Nat Genet.* 2010 April ; 42(4): 338–342. doi:10.1038/ng.542.

## ***PHF6* mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia**

Pieter Van Vlierberghe<sup>1,2,3,\*</sup>, Teresa Palomero<sup>1,4,\*</sup>, Hossein Khiabanian<sup>5</sup>, Joni Van der Meulen<sup>2</sup>, Mireia Castillo<sup>4</sup>, Nadine Van Roy<sup>2</sup>, Barbara De Moerloose<sup>6</sup>, Jan Philippé<sup>7</sup>, Sara González-García<sup>8</sup>, María L Toribio<sup>8</sup>, Tom Taghon<sup>7</sup>, Linda Zuurbier<sup>3</sup>, Barbara Cauwelier<sup>9</sup>, Christine J Harrison<sup>10</sup>, Claire Schwab<sup>10</sup>, Markus Pisecker<sup>11</sup>, Sabine Strehl<sup>11</sup>, Anton W Langerak<sup>12</sup>, Jozef Gecz<sup>13,14</sup>, Edwin Sonneveld<sup>15</sup>, Rob Pieters<sup>3,15</sup>, Elisabeth Paietta<sup>16</sup>, Jacob M Rowe<sup>17</sup>, Peter H Wiernik<sup>16</sup>, Yves Benoit<sup>6</sup>, Jean Soulier<sup>18</sup>, Bruce Poppe<sup>2</sup>, Xiaopan Yao<sup>19</sup>, Carlos Cordon-Cardo<sup>4</sup>, Jules Meijerink<sup>3</sup>, Raul Rabadan<sup>5</sup>, Frank Speleman<sup>2,†</sup>, and Adolfo Ferrando<sup>1,4,20,†</sup>

<sup>1</sup>Institute for Cancer Genetics, Columbia University Medical Center, New York, New York, USA

<sup>2</sup>Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium <sup>3</sup>Department of Pediatric Oncology/Hematology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands <sup>4</sup>Department of Pathology, Columbia University Medical Center, New York, New York, USA <sup>5</sup>Center for Computational Biology and Bioinformatics, Columbia University, New York, New York, USA <sup>6</sup>Department of Pediatric Hemato-Oncology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium <sup>7</sup>Department of Clinical Chemistry, Immunology and Microbiology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium <sup>8</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain <sup>9</sup>Department of Hematology, Hospital St-Jan, Bruges, Belgium <sup>10</sup>Leukaemia Research Cytogenetics Group, Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University, Newcastle, UK <sup>11</sup>Children's Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, Austria <sup>12</sup>Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands <sup>13</sup>Department of Genetics and Molecular Pathology, University of Adelaide, Adelaide, Australia <sup>14</sup>Department of Pediatrics, University of Adelaide, Adelaide, Australia <sup>15</sup>on behalf of the Dutch Childhood Oncology Group (DCOG), The Hague, The Netherlands <sup>16</sup>Montefiore Medical Center North, Bronx, New York, USA <sup>17</sup>Rambam Medical Center and Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel <sup>18</sup>Hematology Laboratory APHP, INSERM U944, Hôpital Saint Louis, Paris, France <sup>19</sup>Department of Biostatistics and Computational Biology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA <sup>20</sup>Department of Pediatrics, Columbia University Medical Center, New York, New York, USA

Users may view, print, copy, download and text and data- mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)

Correspondence should be addressed to A.F. (af2196@columbia.edu).

\*These authors contributed equally to this work.

†These authors jointly directed the project.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS:** P.V.V. performed array CGH and mutation analysis of *PHF6* and wrote the manuscript. T.P. performed exon capture and next-generation sequencing of T-ALL samples and wrote the manuscript. H.K. analyzed next-generation sequencing data. J.V.d.M. performed additional array-CGH analysis and *PHF6* mutation screening in T-ALL and BCP-ALL samples. T.T., N.V.R. and A.W.L. performed experiments. M.C. and C.C.-C. performed and analyzed histological and immunohistochemical staining. J.P. collaborated on *PHF6* mutation screening in BCP-ALL samples. C.J.H. and C.S. collaborated on additional screening for genomic *PHF6* deletions in T-ALL. Y.B., B.D.M. and B.C. collaborated on the *PHF6* mutation screening. R.P. M.P., S.S. and J.S. collaborated on the multi-center array-CGH study. S.G.-G. and M.L.T. performed the isolation of T-cell progenitor cells for expression analysis of *PHF6*. X.Y. performed survival analysis of ECOG T-ALL patients. J.G. provided critical reagents and discussion. E.S. provided samples and correlative clinical data from DCOG. E.P., J.M.R. and P.H.W. provided samples and correlative clinical data from ECOG. J.M. and L.Z. collaborated on the multi-center array-CGH study and *PHF6* mutation analysis, provided molecular data on the characterization of T-ALL and performed survival analysis of *PHF6* mutations in the DCOG series. R.R. designed and directed the analysis of next generation sequencing results. F.S. and B.P. designed the studies and directed research. A.F. designed the studies, directed research and wrote the manuscript.

# SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis

Pilar Esteve<sup>1-3</sup>, Africa Sandoñis<sup>1-3</sup>, Marcos Cardozo<sup>1-3</sup>, Jordi Malapeira<sup>4-6</sup>, Carmen Ibañez<sup>1</sup>, Inmaculada Crespo<sup>1-3</sup>, Severine Marcos<sup>1-3</sup>, Sara Gonzalez-Garcia<sup>1</sup>, Maria Luisa Toribio<sup>1</sup>, Joaquin Arribas<sup>4-6</sup>, Akihiko Shimono<sup>7</sup>, Isabel Guerrero<sup>1</sup> & Paola Bovolenta<sup>1-3</sup>

It is well established that retinal neurogenesis in mouse embryos requires the activation of Notch signaling, but is independent of the Wnt signaling pathway. We found that genetic inactivation of *Sfrp1* and *Sfrp2*, two postulated Wnt antagonists, perturbs retinal neurogenesis. In retinas from *Sfrp1*<sup>-/-</sup>; *Sfrp2*<sup>-/-</sup> embryos, Notch signaling was transiently upregulated because Sfrps bind ADAM10 metalloprotease and downregulate its activity, an important step in Notch activation. The proteolysis of other ADAM10 substrates, including APP, was consistently altered in *Sfrp* mutants, whereas pharmacological inhibition of ADAM10 partially rescued the *Sfrp1*<sup>-/-</sup>; *Sfrp2*<sup>-/-</sup> retinal phenotype. Conversely, ectopic *Sfrp1* expression in the *Drosophila* wing imaginal disc prevented the expression of Notch targets, and this was restored by the coexpression of Kuzbanian, the *Drosophila* ADAM10 homolog. Together, these data indicate that Sfrps inhibit the ADAM10 metalloprotease, which might have important implications in pathological events, including cancer and Alzheimer's disease.

During embryonic development, Notch and Wnt signaling orchestrate cell proliferation and cell fate decisions in a wide variety of tissues. The functional relationship between the two signaling pathways is intricate, and complementary or mutually exclusive activation has been reported during processes such as myogenesis, hematopoiesis and neurogenesis of the telencephalon or neural tube<sup>1</sup>.

Notch and Wnt signaling are also required for the development of the vertebrate neural retina. This structure develops from a neuroepithelium composed of multipotent progenitors, which go through a series of competence states to give rise to six neuronal and one glial cell types<sup>2</sup>. As progenitor cells produce the various cell types, Notch through lateral inhibition maintains neighboring cells in a multipotent, proliferative state, ensuring that sufficient numbers of progenitors are retained for consecutive waves of neurogenesis. Thus, downregulation of Notch is a prerequisite for retinal neuronal differentiation<sup>2</sup>.

Wnt- $\beta$ -catenin signaling has also been implicated in the proliferation of vertebrate retinal precursors. However, in the mouse embryonic neural retina this function is limited to progenitor cells located in the periphery<sup>3,4</sup>. Wnt- $\beta$ -catenin signaling is not active in the central retina, and cell proliferation and differentiation proceed normally in mice with conditional deletion of  $\beta$ -catenin in the neural retina, although retinal lamination is altered<sup>5</sup>. Similarly, retina-specific inactivation of Fzd5, a noncanonical Wnt receptor, mostly influences retinal vasculature formation but has no effect on neurogenesis<sup>6</sup>. Although these results do not strongly implicate Wnt

signaling in retinal differentiation, *Sfrp1* and *Sfrp2*, two members of a family of postulated Wnt antagonists, are strongly expressed in the neural retina throughout neurogenesis<sup>7</sup>—raising the question of whether their function is related to Wnt signaling.

Sfrps (1–5 in mammals) are a family of secreted factors that fold in two independent domains. The cysteine-rich domain (CRD) at the N terminus shares similarities with the extracellular domain of the Wnt receptors Frizzled (Fzd) and ROR<sup>8</sup>. The C-terminal domain contains instead a netrin-related motif (NTR), which characterizes a number of unrelated proteins including Netrin-1, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), complement proteins and type I procollagen C-proteinase enhancer proteins (PCOLCEs)<sup>8</sup>. Owing to their homology to the extracellular portion of Fzd receptors, Sfrps were first described and generally accepted as Wnt antagonists that bind and sequester Wnt ligands, thereby preventing signal activation. Gain of *Sfrp1* or *Sfrp2* function has supported this idea, as excess *Sfrp* function antagonizes Wnt signaling in a variety of contexts<sup>8</sup>. Loss of *Sfrp* function instead points to two additional important features. First, *Sfrp* function might be redundant, because genetic inactivation of individual family members in mice seems to have little effect on embryonic development<sup>9,10</sup>. Double inactivation of *Sfrp1* and *Sfrp2*, by contrast, causes a variety of alterations<sup>9,11,12</sup>, some of which are worsened by the additional inactivation of *Sfrp5* (refs. 9,11). Second, Sfrps have Wnt-independent functions<sup>9,12</sup>, as *Sfrp*-null phenotypes are only partially explained by overactivation of Wnt- $\beta$ -catenin signaling<sup>11</sup> or alterations in the noncanonical Wnt-PCP (planar cell

<sup>1</sup>Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)—Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. <sup>6</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain. <sup>7</sup>Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore. Correspondence should be addressed to P.E. (pesteve@cbm.uam.es) or P.B. (pbovolenta@cbm.uam.es).

Received 22 December 2010; accepted 2 March 2011; published online 10 April 2011; doi:10.1038/nn.2794